

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Sebastian Alexander Lont, M.Sc.
aus Zürich

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2018

Thrombozyten CD40-Ligand induzierte
Endothelzellen-Monozyten Interaktion an
Prädilektionsstellen für die Atherosklerose

Gutachter:

Prof. Dr. Markus Hecker

Prof. Dr. Alexander Dalpke

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	6
Zusammenfassung.....	9
Abstract.....	10
1. Einleitung	11
1.1. Atherosklerose	11
1.2. Rekrutierung zirkulierender Monozyten	14
1.2.1. Endothelzellen	14
1.2.2. CD40, CD40L und Thrombozyten	17
1.2.3. Monozyten und Makrophagen	18
1.2.4. Von-Willebrand-Faktor und ADAMTS-13.....	19
1.2.5. Thrombozyten als „Brückenbauer“ für die Rekrutierung von Monozyten...	20
1.3. Arteriogenese.....	21
1.4. Zielsetzung der Arbeit	23
2. Material	24
2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien	24
2.1.1. Zellkultur.....	24
2.1.2. Tierraum.....	24
2.1.3. Molekularbiologie und Proteinbiochemie.....	25
2.1.4. Histologie	26
2.1.5. ibidi-Perfusion	27
2.1.6. Gefäßperfusion	28
2.2. Operationsbesteck	28
2.3. Puffer-, Fixations- und Färbelösungen.....	29
2.4. Software	36
2.5. Antikörper und Farbstoffe	36
2.6. Primer.....	37
2.7. Chemikalien und Enzyme	38
2.8. Mauslinien.....	40
3. Methoden.....	41
3.1. Zellkultur	41
3.1.1. HUVEC Präparation.....	41
3.1.2. Isolierung von pulmonalen Endothelzellen aus der Mauslunge	42
3.2. Handhabung von Labormäusen	44
3.2.1. Versuchstierhaltung	44
3.2.2. Tötung, Blutabnahme und Perfusion.....	45
3.2.3. Organentnahme.....	45
3.2.4. Isolierung von Thrombozyten aus Vollblut und Fluoreszenzfärbung.....	47
3.2.5. Isolierung von Monozyten aus Knochenmark und Fluoreszenzfärbung.....	48
3.2.6. Endothelzell-spezifische CD40-Knockout-Maus.....	49
3.3. Molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden.....	49
3.3.1. RNA-Extraktion	49
3.3.2. DNA-Extraktion	50
3.3.3. Konzentrationsbestimmung RNA und DNA.....	50

3.3.4. cDNA-Synthese	50
3.3.5. PCR.....	51
3.3.6. Agarose-Gelelektrophorese.....	51
3.3.7. Aufarbeitung der Proben für die Proteinanalyse mittels Western Blot.....	52
3.3.8. Proteinbestimmung nach Bradford	52
3.3.9. SDS-PAGE	52
3.3.10. Western Blot.....	53
3.4. Histologie.....	54
3.4.1. Herstellung von Gefrierschnitten.....	54
3.4.2. Herstellung von Paraffinschnitten.....	55
3.4.3. CD31, CD40 und F4/80 Färbung von Gefrier- und Paraffinschnitten.....	55
3.4.4. HRP-Färbung von Gefrierschnitten.....	56
3.4.5. Oil Red O-Färbung.....	57
3.5. Visualisierung von atherosklerotischen Plaques	58
3.5.1. 2D Ultraschallmessung von Mäusen zur Plaque-Lokalisierung.....	58
3.5.2. 3D Ultraschallmessung von Mäusen zur Plaque-Volumenbestimmung.....	59
3.5.3. Auswertung Plaque-Größe bei Oil Red O-Färbungen.....	60
3.6. Arteriogenese.....	60
3.6.1. Ligatur der Arterien im Mausohr.....	60
3.6.2. Blutflussdarstellung im Mausohr mit dem PSI System.....	61
3.6.3. Farbpartikelperfusion zur Darstellung der Arteriogenese	62
3.7. ibidi Slides.....	63
3.7.1. ibidi Slide HUVEC Aussaat.....	63
3.7.2. Isolation und Färbung humaner Mono-, Thrombo- und Erythrozyten.....	64
3.7.3. ibidi Slide Perfusion.....	65
3.7.4. ibidi Slide Fluoreszenzfärbung nach Perfusion.....	67
3.7.5. Auswertung ibidi Slide Perfusion.....	67
3.8. Gefäßperfuisionsmodell.....	67
3.8.1. Perfusionsplattform.....	67
3.8.2. Gefäßperfusion und Fixierung	69
3.8.3. Fluoreszenzfärbung nach Gefäßperfusion	70
3.8.4. Gefäßperfusion mit Stimulans, Monozyten und Thrombozyten.....	71
3.8.5. Mikroskopaufnahmen von perfundierten Gefäßen.....	72
3.8.6. Berechnung der Perfusionsschubspannung.....	72
3.8.7. Auswertung der Gefäßperfusion.....	73
3.8.8. Visualisierung des Strömungsprofils in der Karotisverzweigung.....	74
3.9. Statistik	74
4. Ergebnisse	75
4.1. Endothelialer CD40-Knockout und Atherosklerose	75
4.1.1. Charakterisierung der induzierbaren endothelialen CD40-KO Maus.....	75
4.1.2. Darstellung von Plaques via Ultraschall.....	77
4.1.3. Darstellung von Plaques via Oil Red O-Färbung.....	78
4.1.4. CD40-Proteinnachweis in Aorten und Zellkulturen.....	79
4.1.5. Einfluss von CD40 auf die Arteriogenese.....	80
4.1.6. Darstellung der Arteriogenese mittels Blutflussmessung	80
4.1.7. Darstellung der Arteriogenese mittels Partikelfärbung.....	81
4.1.8. Einfluss von CD40 auf die Monozyteninfiltration bei Arteriogenese.....	82
4.2. Perfusion ibidi Slides	83
4.2.1. Etablierung.....	83
4.2.2. Etablierung des Transmigrationsslide.....	85
4.2.3. Effekt von sCD40L-Stimulation auf Monozytenbindung im Y-Slide	85
4.3. Perfusion der murinen Karotisverzweigung.....	88
4.3.1. Präparation Karotisverzweigung.....	88

4.3.2.	CD31-, vWF-, Thrombozyten- und Monozytenfärbung im Gefäß	89
4.3.3.	Lokalisation der ULVWF-Multimere in der Gefäßverzweigung	91
4.3.4.	Darstellung der Monozytenadhäsion nach Perfusion	91
4.3.5.	Berechnung von Fluss und Schubspannung im <i>ex vivo</i> -Perfusionssystem... 92	
4.3.6.	Verteilung von adhärenen Monozyten in Gefäßverzweigungen	94
4.3.7.	Flussvisualisierung in der Gefäßverzweigung.....	96
5.	Diskussion	98
5.1.	Induzierbare endotheliale CD40-Depletion in der ApoE-KO Maus	98
5.1.1.	Nachweis der endothelialen CD40-Depletion.....	98
5.1.2.	Plaquedarstellung mithilfe von Ultraschall und Oil Red O-Färbung	100
5.1.3.	Darstellung der CD40-Expression an Gefäßverzweigungen.....	100
5.1.4.	Einfluss von CD40 auf Arteriogenese.....	101
5.2.	Perfusionsversuche in ibidi Y-Slides	102
5.3.	<i>Ex vivo</i>-Perfusionsmodell einer Gefäßverzweigung	104
5.3.1.	Einfluss der CD40L-Stimulation auf die Monozytenadhäsion	105
5.3.2.	Flussdarstellung	107
5.4.	Ausblick.....	108
6.	Literaturverzeichnis.....	110
	Danksagung	121

Abkürzungsverzeichnis

ADAMTS-13	Eine Disintegrin und Metalloprotease mit einem Thrombospondin Typ 1 Motiv, Mitglied 13 (engl. a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13)
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovine Serum Albumin
CCD	Ladungsgekoppeltes Bauteil (engl. charge-coupled device)
CCL5	C-C Motif Chemokin Ligand 5
CD154	CD40 Ligand, CD40L
CD31	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül, auch PECAM-1 genannt (engl. cluster of differentiation 31)
CD40	Tumornekrosefaktorrezeptor-Superfamilie 5 (engl. cluster of differentiation 40)
CD40L	CD40 Ligand, CD154
cDNA	komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
Cy2, Cy3, Cy5	Cyanin-Fluoreszenz-Farbstoffe
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium, standardisiertes Nährmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECGS/H	Endothelzellen-Wachstumsergänzungsmittel mit Heparin (engl. endothelial cell growth supplement with heparin)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. ethylenediaminetetraacetic acid)
ELAM-1	Endotheliales Leukozyten Adhäsionsmolekül-1
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase)
HUVEC	Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (engl. human umbilical vein endothelial cells)

IBF	Interfakultäre Biomedizinische Forschungseinrichtung
ICAM-1	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül-1 (engl. intercellular adhesion molecule-1)
IFN- γ	Interferon- γ
IL-8	Interleukin-8
ITAM	Immunorezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv (engl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif)
KO	Knockout
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte (engl. low-density lipoprotein)
LSCI	Laser Speckle Kontrast Abbildung (engl. laser speckle contrast imaging)
MAC-1	Makrophagen-1 Antigen (engl. macrophage antigen 1)
MACS	Magnetische Zellsortierung (engl. magnetic activated cell sorting)
MCP-1	Monozyten chemotaktisches Protein-1
MMP	Matrix-Metalloprotease
NO	Stickstoffmonoxid (engl. nitric oxide)
ORO	Oil Red O, roter fettlöslicher Azofarbstoff
P-Selektin	Thrombozyten-Selektin (engl. platelet-selectin)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PECAM-1	Thrombozyten- Endothelzellen-Adhäsionsmolekül, auch CD31 genannt (engl. platelet and endothelial cell adhesion molecule-1)
Pen	Penicillin
PGE1	Prostaglandin E1
PIM	Proteinase Inhibitor Mix
PRP	Plättchen (Thrombozyten) reiches Plasma
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
PU	Perfusionseinheit (engl. perfusion unit)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
sCD40L	löslicher CD40 Ligand (engl. soluble CD40 ligand)
SDS	Sodiumdodecylsulfat

SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SMC	Glatte Muskelzellen (engl. smooth muscle cells)
Strep	Streptomycin
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (engl. tris-buffered saline)
TBS-T	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAF6	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 6
TXA ₂	Thromboxan-A ₂
ULVWF	Ultra-langer von-Willebrand-Faktor (engl. ultra large vWF)
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 (engl. vascular cell adhesion molecule-1)
vs.	versus
vWF	Von-Willebrand-Faktor
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

Zusammenfassung

Durch die gesteigerte Lebenserwartung in Industrienationen werden in fortgeschrittenem Alter auftretende Krankheiten wie die koronare Herzkrankheit immer prävalenter. Ihr zugrunde liegt die Atherosklerose, bei der die Rekrutierung von Monozyten an Prädilektionsstellen für die Entstehung von atherosklerotischen Plaques, z.B. an Gefäßbiegungen und -verzweigungen, zu einer zunehmenden Stenosierung des Gefäßlumens führt. Sowohl bei der Monozytenrekrutierung als auch bei der in der Gefäßwand auftretenden Entzündung spielen CD40-Rezeptor- und CD40-Ligand-Interaktionen eine wichtige Rolle. In dieser Arbeit wird deshalb der Frage nachgegangen, ob eine vermehrte endotheliale CD40-Expression an den Atherosklerose-Prädilektionsstellen für die Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten in der Frühphase der Atherosklerose verantwortlich ist.

Hierfür wurde zunächst eine ApoE-Knockout-Mauslinie mit Tamoxifen-induzierter Depletion von endotheliale CD40 generiert, bei der das Voranschreiten der Plaqueentwicklung in der Frühphase der Atherosklerose mittels Ultraschallbildgebung und Oil Red O-Färbung quantifiziert werden sollte. Aufgrund der fehlenden Verifizierbarkeit des endothelialen CD40-Knockout wurde mit einem humanen *in vitro*-Modell der Gefäßverzweigung, dem ibidi Y-Slide, das Adhäsionsverhalten von fluoreszenzfarbstoffgefärbten Monozyten an Endothelzellen via Thrombozyten-besetzten ultra-langen von-Willebrand-Faktor (ULVWF)-Multimeren mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dabei wurde nach Zugabe von löslichem sCD40-Ligand (sCD40L) eine signifikante Zunahme der ULVWF-Multimer-Freisetzung und Monozytenadhäsion im Bereich der Verzweigung festgestellt.

Diese Ergebnisse konnten in einem neuartigen murinen *ex vivo*-Perfusionsmodell der *A. carotis* Verzweigung reproduziert werden. Dazu wurden isolierte und fluoreszenzfarbstoffgefärbte murine Monozyten und Thrombozyten durch eine isoliert perfundierte Verzweigung der *A. carotis communis* der Maus perfundiert, die im Anschluss mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert wurde. Zusätzlich zeigte sich in diesen Versuchen, dass in Gefäßen von ApoE-Knockout Mäusen nach sCD40L-Stimulation hoch signifikant zehnmal mehr Monozyten adhäreren als in nicht-stimulierten Gefäßen dieser Tiere. Gegenüber stimulierten Gefäßen von Wildtyp, CD40-Knockout und vWF-Knockout Mäusen war die Adhäsion der Monozyten um den Faktor vier gesteigert. Somit konnte sowohl in einem humanen wie murinen *ex vivo*-Perfusionsmodell die CD40-Abhängigkeit der ULVWF-Multimer-Freisetzung und Monozytenadhäsion im Bereich einer klassischen Atherosklerose-Prädilektionsstelle nachgewiesen werden.

Dieses neuartige *ex vivo*-Perfusionsmodell der Gefäßverzweigung stellt somit eine interessante Methode zur Untersuchung des Adhäsionsverhalten von Monozyten dar und könnte helfen die komplexen pathophysiologischen Vorgänge in der Frühphase der Atherosklerose besser zu verstehen.

Abstract

The ever-increasing life expectancy in industrial nations leads to an increased occurrence of age-related diseases like ischemic heart disease. Atherosclerosis is the underlying cause where monocytes are recruited to plaque predilection sites, e.g. at vessel curvatures and bifurcations, leading to increased stenosis of the vessel lumen. CD40 receptor and CD40 ligand interactions play an important role in monocyte recruitment as well as in inflammation of the vessel wall. The aim of this project therefore is to investigate, if an increased endothelial CD40 expression at atherosclerosis predilection sites is responsible for the recruitment and activation of monocytes in the early phase of atherosclerosis.

For this purpose, an inducible transgenic ApoE knockout mouse model with tamoxifen-induced endothelial cell-specific depletion of CD40 was generated. Using this model, it was planned to quantify plaque development and progression in the early phase of atherosclerosis by means of high-resolution ultrasound imaging and oil red O staining.

Because it was not possible to verify the specific depletion of CD40 in the endothelial cells, a human *in vitro* vessel bifurcation model, the ibidi Y-Slide, was used to investigate the adhesion behaviour of fluorescent dye stained monocytes to endothelial cells via platelet-decorated ultra-large von Willebrand factor (ULVWF) multimers by means of fluorescence microscopy. Thereby, a significant increase of ULVWF multimer release and monocyte adhesion in the vicinity of the bifurcation was detected.

These findings could be reproduced in a novel murine *ex vivo* perfusion model. Herein the isolated *A. carotis communis* with the following bifurcation into the *A. carotis interna* and *A. carotis externa* was perfused with isolated and fluorescent dye labelled murine monocytes and platelets, and subsequently analysed by way of fluorescence microscopy. In addition, a highly significant ten-fold increase in monocyte adhesion within vessels of ApoE knockout mice could be observed after stimulation with soluble CD40 ligand. In comparison to stimulated vessels of wild type, CD40 knockout and vWF knockout mice the increase in monocyte adhesion was fourfold. Thus, the CD40 dependency of ULVWF multimer release and monocyte adhesion at a classical atherosclerosis predilection site could be demonstrated in a human as well as in a murine perfusion model.

This novel *ex vivo* bifurcation perfusion model represents an interesting method for investigating monocyte adhesion behaviour and could assist in improving the understanding of the complex pathophysiological processes in the early phase of atherosclerosis.

1. Einleitung

1.1. Atherosklerose

Die koronare Herzkrankheit ist weltweit, insbesondere in Industrienationen, die häufigste Todesursache (WHO, 2017). Hierbei handelt es sich um eine chronische Erkrankung der Herzmuskulatur, wobei diese unter einer Unterversorgung mit Blut und Sauerstoff aufgrund von Verengungen oder Verschlüssen der Koronararterien leidet. Symptomatisch äußert sich dies in Angina pectoris-Schmerzen (Brustenge). Mit zunehmendem Alter und Fortschreiten der Erkrankung treten gehäuft Herzrhythmusstörungen, Herzinfarkte oder der plötzliche Herztod auf. Aufgrund der gesteigerten Lebenserwartung in Industrienationen (Roser, 2018) ist in diesen Ländern mit einer steten Zunahme des Auftretens der sogenannten ischämischen Kardiomyopathie zu rechnen. Die koronare Herzkrankheit tritt symptomatisch zwar erst im fortgeschrittenen Alter auf, hat jedoch eine lange präklinische Phase. Diese beginnt bereits im Kindesalter, wenn Fetteinlagerungen, auch „fatty streaks“ genannt, die ersten Gefäßveränderungen einleiten (Stier *et al.*, 2018). Diese Fettstreifen entwickeln sich weiter zu atherosklerotischen Plaques. Die Plaquebildung hat eine zunehmende Stenosierung der Koronararterien und damit Durchblutungsstörungen des Herzens zur Folge, was die zuvor beschriebenen Symptome auslöst. Somit leisten Forschungsarbeiten zur Entstehung und Beeinflussung der Atherosklerose einen wichtigen Dienst für die Bevölkerung.

Bei der Atherosklerose, die primär zur Bildung exzentrischer Plaques und einer generellen Verhärtung der großen Leitungsarterien führt, ist es u.a. die Einlagerung von Cholesterin-gebundenen Fettsäuren und Calciumphosphat in die *Tunica intima* der arteriellen Gefäßwand, welche die Plaquebildung vorantreibt. Die eher langsame Bildung dieser Plaques führt in der Folge zu einer progredienten chronischen Minderdurchblutung der betroffenen Blutgefäße und den von ihnen versorgten Arealen des Herzens und/oder zu einem subtotalen oder totalen Gefäßverschluss durch Thrombusbildung nach Ruptur sogenannter vulnerabler Plaques. Letztere bilden sich wesentlich schneller und sind durch einen besonders hohen Grad der Entzündung gekennzeichnet. Je nach Ereignisort bedingt der Gefäßverschluss verschiedene Folgekrankheiten. In den Beinen führt die periphere arterielle Verschlusskrankheit bis zur Gangrän bedingten Amputation. Verschlüsse in den Koronararterien verursachen Herzinfarkt, plötzlicher Herztod und die bereits angesprochene ischämische Kardiomyopathie. Im Halsbereich oder Gehirn führt ein Gefäßverschluss zum Schlaganfall.

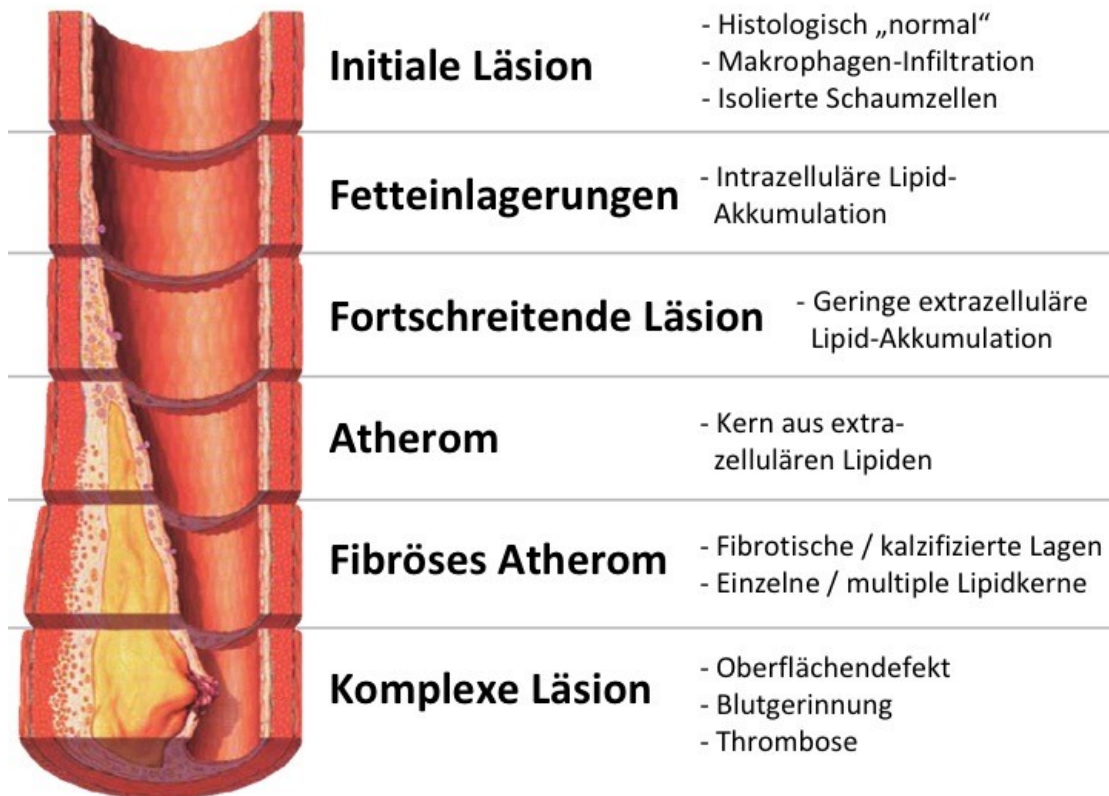


Abbildung 1: Bildung atherosklerotischer Plaques

Schon ab dem ersten Lebensjahrzehnt bilden sich initiale Läsionen und Fetteinlagerungen in den Arterien. Ab dem dritten Jahrzehnt schreiten die Läsionen fort und es bilden sich atherosklerotische Plaques, auch Atherome genannt. Ab dem vierten Jahrzehnt bilden sich fibröse Kappen auf den Atheromen und es kann zur Ruptur der Plaques mit Bildung von Blutgerinnseln und Thrombose kommen (Abbildung modifiziert nach (Pepine, 1998)).

Zur Ursache der atherosklerotischen Plaquebildung gab es bislang zwei Hypothesen. Bei der „response-to-injury“-Hypothese führt eine Verletzung der Endothelzellschicht, durch Bluthochdruck, Bakterientoxine, Virenbefall oder andere Faktoren, zu vermehrter Lipideinlagerung mit nachfolgender Schaumzellenbildung (Ross *et al.*, 1977). Bei der „response-to-retention“-Hypothese führen ein erhöhter Lipoproteingehalt im Blut, metabolische Unterschiede der Gefäßzellen oder andere Faktoren zu einer erhöhten Zurückhaltung der Lipoproteine in der Gefäßwand und letztlich zur vermehrten Schaumzellbildung. Eine simple Schädigung der Endothelzellschicht erfolgt in der Regel nicht und ist weder nötig noch alleine ausreichend für die Bildung von Läsionen (Williams und Tabas, 1995). Seit jüngerer Zeit wird daher die endotheliale Dysfunktion als Ursache der Atherosklerose angesehen. Die endotheliale Dysfunktion wird durch eine verminderte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) charakterisiert. Dies führt zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen, erhöhter Synthese von entzündungs- und thrombusfördernden Faktoren und erhöhtem oxidativem Stress (Ross, 1999). Als Folge davon wandern im Blut zirkulierende Monozyten in das Gefäßgewebe ein,

differenzieren zu Makrophagen und werden durch Aufnahme von oxidierten LDL zu Schaumzellen (Sitia *et al.*, 2010). Der weitere Verlauf der Krankheit ist in allen Fällen gleich. Die Bildung der Schaumzellen löst eine Entzündung aus, wodurch weitere Monozyten zur betroffenen Stelle gelockt werden, was wiederum die Schaumzell-Bildung verstärkt. Die Fläche und das Volumen des Plaques nimmt zu, wobei die absterbenden Schaumzellen einen nekrotischen Kern bilden. Glatte Gefäßmuskelzellen (SMCs) proliferieren und migrieren und tragen so zur Bildung einer den Plaque bedeckenden Bindegewebsschicht bei (Abbildung 1, Seite 12). Zusätzlich können sie sich ebenfalls in Schaumzellen umwandeln und stellen möglicherweise sogar das Groß dieser Zellen im Plaque dar.

Die atherosklerotische Plaquebildung erfolgt an den Prädilektionsstellen für Atherosklerose, die sich hauptsächlich nach Gefäßverzweigungen an den äußeren Wänden der Tochtergefäße und in Biegungen befinden. Der Flussteiler und die inneren Wände der Tochtergefäße bleiben frei von Plaques. Die Plaquebildungsstellen stimmen mit Stellen überein, an denen der Blutfluss langsam oder nicht-laminar ist (Abbildung 2, Seite 13). Niedrige Blutfluss-geschwindigkeiten und die daraus folgende, auf die Gefäßwand einwirkende geringe Schubspannung sind somit entscheidend für die Entstehungsorte der Plaques (Asakura und Karino, 1990; Gibson *et al.*, 1993).

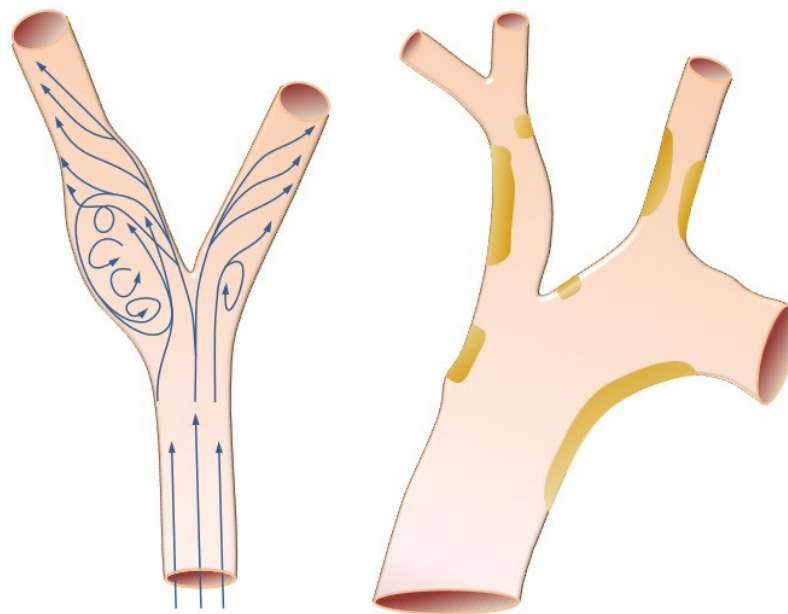


Abbildung 2: Blutflussbedingungen und Plaquebildungsstellen

Darstellung einer arteriellen Verzweigung mit Bereichen, die ein laminares oder ein nicht-laminares Flussprofil aufweisen (links). Aortenbogen mit markierten Stellen, an denen Schubspannung und periphere Wandspannung im Ungleichgewicht sind. An diesen Stellen ist die unidirektionale Schubspannung reduziert, während die periphere Wandspannung erhöht ist. Dies resultiert in endothelialer Dysfunktion und führt zur Bildung von atherosklerotischen Läsionen (Cattaruzza *et al.*, 2012).

Zur Behandlung von etablierten atherosklerotischen Plaques mit drohendem Gefäßverschluss oder drohender Ruptur bleiben nur invasive Eingriffe, wie die Gefäßdilatation mittels perkutaner transluminaler Ballonangioplastie, bei der in der Regel eine Gefäßstütze (sogenannter Stent) an die aufgedehnte Stelle platziert wird oder das Entfernen der Plaques durch Atherektomie (ebenfalls kathetergestütztes Abtragen der Plaques mithilfe einer Gefäßfräse/Bohrer), übrig.

Medikamentöse Behandlungen waren in Tests mit weniger als 10 % Rückgang des Plaquevolumens (bei allerdings stabilen Plaques mit > 70 % Lumeneinengung) nach Statin-Behandlung eher erfolglos (Dave *et al.*, 2013). Deshalb sind die Plaquestabilisation oder das im Fokus dieser Arbeit liegende Verhindern des Auftretens von Plaques (Primärprävention) die vielversprechendsten therapeutischen Ansätze gegen Atherosklerose.

1.2. Rekrutierung zirkulierender Monozyten

Die Einwanderung von Monozyten, einer Unterkategorie der Leukozyten, in die Gefäßwand spielt bei der Initiation der Atherosklerose als chronische Entzündungskrankheit eine entscheidende Rolle. Die Rekrutierung der Monozyten hängt dabei von mehreren Faktoren ab, die in den folgenden Kapiteln im Einzelnen vorgestellt werden.

1.2.1. Endothelzellen

Endothelzellen kleiden als innerste, einlagige Zellschicht Lymph- und Blutgefäße aus und weisen je nach Organ eine unterschiedliche Beschaffenheit auf. Das kontinuierliche Endothel in Herz, Lunge, Haut und der Blut-Hirn-Schranke besitzt eine durchgehende Basalmembran und weist eine sehr geringe Permeabilität für im Blut gelöste Stoffe auf. Das fenestrierte Endothel in Darm, exo- und endokrinen Drüsen und Nierenglomeruli verfügt zwar auch über eine kontinuierliche Basalmembran, weist jedoch aufgrund der meist mit Diaphragmen versehenen kleinen Öffnungen eine größere Permeabilität auf. Das diskontinuierliche Endothel in der Leber besitzt eine schwach und lückenhaft ausgebildete Basalmembran mit Öffnungen ohne Diaphragmen und ist daher sehr durchlässig. Das Endothel wurde lange Zeit nur als Barriere zwischen Blut und Gewebe mit gewissen Transportfunktionen angesehen. So können Flüssigkeiten und sehr kleine gelöste Stoffe per Filtration parazellulär durch die Endothelzellschicht aufgenommen werden, während Makromoleküle den transzellulären Weg mittels Vesikeln oder transendothelialen Kanälen benutzen (Aird, 2007). Eine Besonderheit stellt die Blut-Hirn-Schranke dar, hier erfolgt Stoffaustausch primär aktiv über entsprechende Transport- oder Ionenkanal-

proteine. Neben dieser Transportfunktion hat das Endothel noch viele weitere Funktionen. So reguliert es die Immunantwort durch Entzündungen, verhindert die Blutgerinnung im Ruhezustand, ist aber auch an derselben beteiligt, reguliert das Wachstum des Gefäßes in Vaskulogenese und Angiogenese, produziert EZM-Komponenten und reguliert den Blutfluss und die Gefäßdurchblutung durch Beeinflussung des Gefäßtonus (Sumpio *et al.*, 2002).

Die Funktion des Endothels wird von vielen Faktoren beeinflusst, einer der wichtigsten davon ist NO. NO wird schubspannungsabhängig von dem Enzym NO-Synthase-3 in Endothelzellen aus der Aminosäure L-Arginin gebildet. Seine Produktion in Endothelzellen und Abgabe ins Blut und an die umliegenden glatten Gefäßmuskelzellen (SMC) hat eine antientzündliche, antiproliferative und antithrombotische Wirkung zur Folge. Eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit durch endotheliale Dysfunktion, wodurch auch das Endothel selbst seinen Phänotyp von u.a. antientzündlich zu proentzündlich ändert, steht in Verbindung mit vielen Risikofaktoren der Atherosklerose wie z.B. Hypercholesterinämie, arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus, sowie weiteren kardiovaskulären Erkrankungen (Dimitris *et al.*, 2012). Das Endothel befindet sich jedoch nicht immer in einem durch NO aufrechterhaltenem Ruhezustand, sondern unterliegt auch Veränderungen. Bei der Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) kann das Endothel selbst alle Proteine für die Basalmembran und die notwendigen Enzyme wie MMP für deren Umbau produzieren (Félétou, 2011).

Eine lokale Aktivierung des Endothels kann ausgelöst werden durch mechanische Deformation, chemische Reize, Krankheitserreger, CD40L von Thrombozyten oder anderen Reizen und führt zur Expression und Sekretion von Chemokinen (z.B. IL-8, CCL5, MCP-1), Adhäsionsmolekülen (z.B. ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1) und EZM regulierenden Enzymen (z.B. MMP-1,-2,-3,-9,-11,-13) (Chatzigeorgiou *et al.*, 2009). Bei der Atherosklerose geschieht dies bevorzugt an deren Prädispositionsstellen, wo die Expression des CD40-Rezeptors in Cholesterin-gefütterten LDL-Rezeptor-KO-Mäusen erhöht ist (Korff *et al.*, 2007).

Durch die zuvor genannten Faktoren bzw. aufgrund der endothelialen Dysfunktion wird ein Prozess in Gang gesetzt, bei dem Leukozyten aus dem Blutstrom an die Endothelzellschicht rekrutiert werden (Abbildung 3, Seite 16). Als erster Schritt werden hierfür von Endothelzellen Chemokine wie MCP-1 exprimiert und freigesetzt, um Leukozyten, vor allem Monozyten, anzulocken. Die Chemokine können von MMPs proteolytisch abgebaut werden und haben somit einen Einfluss auf die Rekrutierung von Monozyten (Van Lint und Libert, 2007). Endotheliale Selektine vermitteln das Haften und Rollen der Monozyten. Die Interaktion mit den Adhäsionsmolekülen VCAM-1 und ICAM-1 der Endothelzellen führt zu einer festen Bindung (Ley *et al.*, 2007). Üblicherweise findet die Transmigration, im Fall von Leukozyten wie Monozyten auch

Leukodiapedese genannt, an den Zell-Zell-Verbindungen der Endothelzellen statt. Monozyten können dabei parazellulär durch die Zwischenräume der Endothelzellen transmigrieren. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass sie transzellulär durch die Endothelzelle selbst transmigrieren (Britta und Hartwig, 2004). Der Transmigrationsvorgang ist stark ICAM-1 abhängig, bei der Atherosklerose ist dessen Expression auf Endothelzellen erhöht (Lawson und Wolf, 2009).

Aufgrund der hohen Expression von endothelialen Selektinen, ICAM-1, VCAM-1 und der geringen Strömungsgeschwindigkeit des Blutes sind die postkapillären Venolen unter normalen Bedingungen der Hauptort der Leukodiapedese (Scalia, 2013). In den Arterien mit generell höheren Strömungsgeschwindigkeiten ist die Leukodiapedese nur an den Prädilektionsstellen für die Atherosklerose möglich, weil an diesen Stellen das Flussprofil aufgrund von Gefäßbiegungen oder Verzweigungen verändert ist. In diesen Bereichen liegt eine geringere Strömungsgeschwindigkeit vor, ähnlich zu den Bedingungen in den postkapillären Venolen und ermöglicht die Leukodiapedese mittels den zuvor beschriebenen Chemokine und Adhäsionsmoleküle (Mow *et al.*, 2012).

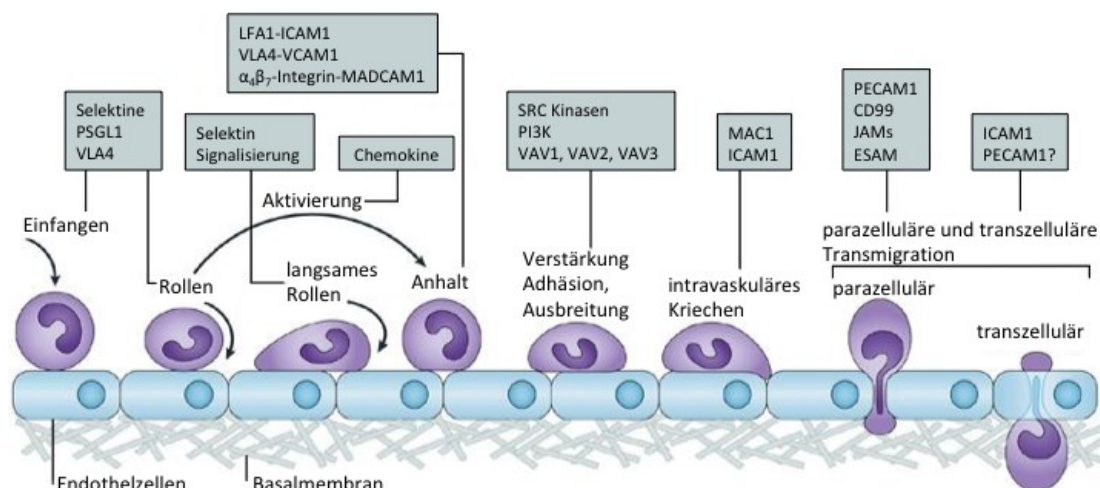


Abbildung 3: Schema der Monozyten-Endothel Interaktion

Darstellung der Rekrutierung von Monozyten an Endothelzellen und ihre Transmigration. Schlüsselmoleküle der jeweiligen Interaktion sind in den grauen Kästchen angegeben. ESAM, Endothelzellen-selektives Adhäsionsmolekül; ICAM1, intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1 (engl. intracellular adhesion molecule 1); JAM, Zellkontakt-Adhäsionsmolekül (engl. junctional adhesion molecule); LFA1, Lymphozytenfunktion-assoziiertes Antigen 1 (engl. lymphocyte function-associated antigen 1) auch bekannt als $\alpha_L\beta_2$ -Integrin; MAC1, Makrophagen Antigen 1 (engl. macrophage antigen 1); MADCAM1, mukosales vaskuläres Addressin Zell-Adhäsionsmolekül 1 (engl. mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule 1); PECAM1, Thrombozyten/Endothel-Zell-Adhäsionsmolekül 1 (engl. platelet/endothelial cell adhesion molecule 1); PI3K, Phosphoinositid-3-Kinase; VCAM1, vaskuläres Zell-Adhäsionsmolekül 1 (engl. vascular cell adhesion molecule 1); VLA4, sehr spätes Antigen 4 (engl. very late antigen 4) auch bekannt als $\alpha_4\beta_1$ -Integrin (Darstellung modifiziert nach (Ley *et al.*, 2007)).

1.2.2. CD40, CD40L und Thrombozyten

CD40 kommt hauptsächlich auf Immunzellen, wie z.B. B-Zellen, Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen vor, aber auch auf Endothelzellen, Epithelzellen, SMCs, Keratinozyten, Fibroblasten und Thrombozyten. CD40L wurde ebenso auf einer Vielzahl von Zellen beschrieben, z.B. Leukozyten, Endothelzellen, Epithelzellen, SMCs und Thrombozyten, jedoch wird CD40L auf diesen Zellen nur nach Induzierung und kurzfristig exprimiert (Chatzigeorgiou *et al.*, 2009). Die lösliche Form des CD40L stammt hingegen hauptsächlich von aktivierten Thrombozyten (Aarts *et al.*, 2017).

Durch CD40-CD40L-Interaktion werden Signalwege aktiviert, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und somit zur Expression von Mediatoren, wie z.B. Adhäsionsmolekülen, Cytokinen, Wachstumsfaktoren und MMPs führen. Hierdurch spielt der CD40-CD40L-Signalweg eine Schlüsselrolle bei Entzündungsprozessen. Daraus ergibt sich auch eine Beteiligung bei der Pathogenese und dem Voranschreiten vieler Entzündungs- und Autoimmunerkrankungen (Chatzigeorgiou *et al.*, 2009).

CD40L wurde bereits in verschiedenen Studien als therapeutisches Ziel untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei Transplantationen das Blockieren von CD40L mittels Antikörpern zu einer Erhöhung der Lebensdauer des Transplantates führte (Elgueta *et al.*, 2009). In ApoE-KO Mäusen führte die Inhibition des CD40-CD40L-Signalwegs mittels anti-CD40L-Antikörpern zu einem verminderten Wachstum von Plaques in der Frühphase der Atherosklerose. Diese Plaques wiesen weniger Makrophagen, mehr SMCs und mehr Kollagen auf, was die Plaques stabiler gegen Ruptur macht (Schönbeck *et al.*, 2000). Bei Atherosklerose führte ein Unterdrücken des CD40-TRAF6-Signalweges zu einem antientzündlichen Profil des Immunsystems, welches vor Atherosklerose schützte (Seijkens *et al.*, 2018). Ein generelles Blockieren des CD40-CD40L-Signalwegs ist allerdings klinisch bedenklich, weil dadurch das Risiko für Thromboembolien und fehlende Immunantwort steigt (Aarts *et al.*, 2017). Eine Unterbrechung des CD40-CD40L-Signalwegs reduziert die B-Zell-abhängige Antikörperbildung und interferiert folglich mit der Immunantwort (Elgueta *et al.*, 2009).

Thrombozyten werden im Knochenmark aus abgeschnürten Fragmenten des Zytoplasmas von Megakaryozyten gebildet und dann in den Blutkreislauf abgegeben. Sie sind vor allem im Rahmen der primären Hämostase für die Blutstillung und den Wundverschluss wichtig. Dabei werden die Thrombozyten durch Bindung an das bei Verletzungen der Blutgefäßwand exponierte mit Von Willebrand-Faktor (vWF) dekorierte, subendotheliale Kollagen der EZM mittels des Glykoprotein Ib-Signalwegs aktiviert und aggregieren. Eine Aktivierung der Thrombozyten ohne folgendes Aggregieren ist jedoch auch über den ITAM-Signalweg möglich (Yun *et al.*, 2016). Aktivierte Thrombozyten fungieren als

Brücke für die Monozyten-Endothel-Interaktion via Thrombozyten-dekorierten ultra-langen vWF (ULVWF)-Multimeren (Kapitel 1.2.5, Seite 20). Dabei gehen sie einerseits mittels Glykoprotein Ib eine feste Bindung mit ULVWF-Multimeren ein (Canobbio *et al.*, 2004), andererseits interagieren sie mittels P-Selektin mit PSGL-1 von Monozyten und Endothelzellen (Blair und Flaumenhaft, 2009).

Eine weitere wichtige Rolle spielen die Thrombozyten bei Entzündungsprozessen, wo sie die Hauptquelle des CD40L und seiner löslichen Form, sCD40L, sind. Nicht-aktivierte Thrombozyten exprimieren kaum CD40L auf ihrer Oberfläche. Nach Aktivierung werden jedoch große Mengen an CD40L, die auch in α -Granula gespeichert sind, an die Zelloberfläche transloziert. MMP-2 und MMP-9 spalten sCD40L vom CD40L an der Zelloberfläche ab und entlassen es in den Blutstrom (Aloui *et al.*, 2014). Sowohl CD40L als auch sCD40L kommen als Homotrimere vor. In dieser Form können sie mit CD40 auf Endothelzellen und Monozyten interagieren (Aloui *et al.*, 2014). CD40L kann aber auch unabhängig von CD40 mittels MAC-1 mit Monozyten interagieren (Antoniades *et al.*, 2009).

1.2.3. Monozyten und Makrophagen

Monozyten und Makrophagen sind ein wichtiger Teil der unspezifischen und der spezifischen Immunantwort. Als Fresszellen phagozytieren sie körperfremde Partikel und Mikroorganismen, lösen sie auf und präsentieren Abbauprodukte als Antigene auf ihrer Oberfläche. Durch die Antigenpräsentation aktivieren sie die spezifische Immunantwort. Monozyten werden im Knochenmark unter Einfluss von verschiedenen Wachstumsfaktoren aus hämatopoetischen Stammzellen gebildet. Dabei verlassen sie das Knochenmark und zirkulieren bis zu drei Tage im Blutsystem, bevor sie durch Apoptose zugrunde gehen (Parihar *et al.*, 2010). Zirkulierende Monozyten können, verstärkt durch Chemotaxis, innerhalb von Stunden in entzündetes Gewebe einwandern. Die transmigrierenden Monozyten werden danach gemäß der im Gewebe vorherrschenden Mikroumgebung aktiviert (Italiani und Boraschi, 2014) und exprimieren entweder entzündungsfördernde (TNF, IL-1, IL-12) oder entzündungshemmende Substanzen (IL-6, IL-10) (Opal und DePalo, 2000). Die Mikroumgebung im Gewebe ist also dafür entscheidend, ob entzündungsfördernde M1-Makrophagen oder gewebereparaturfördernde M2-Makrophagen entstehen (Jakubzick *et al.*, 2017).

M1-Makrophagen fördern die Entzündungsreaktion und locken durch Chemokine weitere Monozyten zum Ort der Entzündung. M2-Makrophagen phagozytieren mit Scavenger-Rezeptoren oxidiertes LDL, welches in seiner unoxidierten Form Cholesterin aus dem Blutstrom ins Gewebe eingebracht hat. Durch die ungebremste Aufnahme von oxidiertem LDL transformieren die M2-Makrophagen zu Schaumzellen. Eine Anhäufung von Schaumzellen wird als „fatty streak“ bezeichnet und gilt als Erstmanifestation der Bildung

atherosklerotischer Plaques. Die Apoptose der Schaumzellen führt zur Bildung eines nekrotischen Kerns im Plaque. Rupturiert ein instabiler Plaque, wird der nekrotische Kern exponiert und es bildet sich ein Thrombus, der zum Gefäßverschluss führen kann (Woollard und Geissmann, 2010). Die Instabilität der Plaques wird durch von Monozyten und Makrophagen sekretierte MMPs ausgelöst, die Kollagen auflösen und somit die EZM destabilisieren (Newby, 2008).

1.2.4. Von-Willebrand-Faktor und ADAMTS-13

Wie Thrombozyten spielt auch der vWF eine wichtige Rolle in der Blutstillung. VWF wird hauptsächlich von Endothelzellen als Monomer produziert, im endoplasmatischen Retikulum dimerisiert und im Golgi-Apparat zu ULVWF-Multimeren zusammengefügt. ULVWF-Multimere werden entweder in das Bindegewebe der subendothelialen EZM sekretiert, wo sie an Kollagen binden, oder in Weibel-Palade-Körperchen in den Endothelzellen eingespeichert. Bei Verletzungen der Endothelzellschicht wird das Kollagen des darunter liegenden Bindegewebes freigelegt und der daran angelagerte vWF durch den Blutfluss zu den ULVWF-Multimeren fadenförmig langgezogen (Sadler, 1998). Thrombozyten binden sofort mittels Glykoprotein Ib (Canobbio *et al.*, 2004) an die ULVWF-Multimere, werden aktiviert und aggregieren. Der entstehende Thrombus kann zu einem kompletten Gefäßverschluss und nachfolgenden Schlaganfall oder Herzinfarkt führen.

Die vWF-Freisetzung kann jedoch nicht nur durch mechanische Verformung oder Verletzung des Endothels, sondern auch als zelluläre Reaktion auf Entzündungsmediatoren, wie z.B. Histamin und Prostaglandine, ausgelöst werden. Auch auf aktivierten Thrombozyten exprimierter CD40L oder von aktivierten Thrombozyten abgespaltener sCD40L kann bei Kontakt mit den Endothelzellen die ULVWF-Exozytose von Weibel-Palade-Körperchen zur luminalen Gefäßseite auslösen (Möller *et al.*, 2015). Aufgrund von P-Selektin (Padilla *et al.*, 2004) oder Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Verankerungen (Huang *et al.*, 2009) an den Endothelzellen werden die ULVWF-Multimere langgezogen und nicht einfach vom Blutstrom mitgerissen. Dadurch kommt es zu einem Wechsel von einem primär antientzündlichen, gerinnungshemmenden zu einem pro-inflammatorischen, prokoagulatorischen Zustand des betroffenen, ansonsten intakten Endothels.

Als Gegenspieler zur ULVWF-Multimer-vermittelten Thrombusbildung fungiert die zinkhaltige Metalloprotease ADAMTS-13. ADAMTS-13 spaltet ULVWF-Multimere an bestimmten Spaltungssequenzen (Abbildung 4, Seite 20), so dass diese nicht mehr Thrombozyten binden und aktivieren können (Dong, 2005). Bei einer verminderten ADAMTS-13-Aktivität, wie z.B. bei der erblich bedingten

thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura, kommt es zu hohen ULVWF-Multimer-Spiegeln im Blut und damit zu einer spontanen Aktivierung von Thrombozyten (Lian, 2005). Auch bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit wurden verringerte ADAMTS-13-Aktivitäten festgestellt (Shen *et al.*, 2012). Es ist bislang nicht ausreichend geklärt, ob hohe vWF- und niedrige ADAMTS-13-Spiegel Risikofaktoren oder nur Marker für die Atherosklerose sind (Sonneveld *et al.*, 2014).

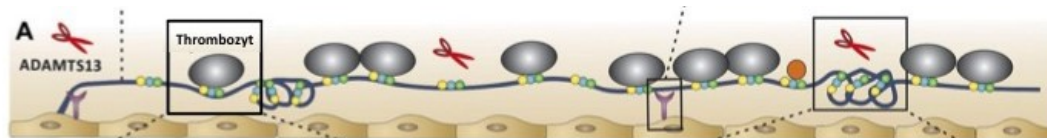


Abbildung 4: Schema der Interaktion von ADAMTS-13 mit ULVWF-Multimeren

Ein ULVWF-Multimer haftet mittels P-Selektin oder Integrin $\alpha_v\beta_3$ (violette Y) an Endothelzellen und wird durch den Blutfluss fadenförmig langgezogen. An den langgezogenen Bereichen werden die ansonsten verdeckten A1 (gelb), A2 (blau) und A3 (grün) Domänen exponiert. Hierdurch können an der A1-Domäne Thrombozyten mit dem Glykoprotein Ib anhaften, an der A2-Domäne ADAMTS-13 (rote Schere) zum Abtrennen des ULVWF-Multimers ansetzen und an der A3-Domäne das ULVWF-Multimer bei vaskulären Verletzungen an das exponierte Kollagen binden (Darstellung modifiziert nach (De Ceunynck *et al.*, 2013)).

1.2.5. Thrombozyten als „Brückenbauer“ für die Rekrutierung von Monozyten

Wie zuvor beschrieben, ist die allgemeine Auffassung, dass Monozyten Selektin-vermittelt an die Endothelzellschicht binden und dort entlangrollen, bevor sie schließlich haften bleiben und in die Gefäßwand transmigrieren (Ley *et al.*, 2007). Ohne weitere Hilfsfaktoren ist dies allerdings nur unter niedrigen Flussgeschwindigkeiten möglich. Daher wird in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass unter normalen Flussbedingungen nach CD40-Stimulation die an ULVWF-Multimeren haftenden Thrombozyten als „Brücke“ zu einer Monozyten-Endothel-Interaktion dienen. Dies kann die Rekrutierung von Monozyten an Endothelzellen, ihre Diapedese und Differenzierung zu Makrophagen erleichtern (Möller *et al.*, 2015). Eine schematische Darstellung dieser Interaktionshypothese ist in Abbildung 5, Seite 21 abgebildet.

Aktivierte Thrombozyten binden mit ihrem CD40L oder freigesetzter sCD40L bindet an den CD40-Rezeptor auf Endothelzellen. Hierdurch wird eine interne Signalkaskade gestartet, die letztlich zu einem Anstieg der zyttoplasmatischen Kalzium-Konzentration (Ca^{2+}) führt. Danach fusionieren die Weibel-Palade-Körperchen mit der Zellmembran der Endothelzellen und die in ihnen gespeicherten ULVWF-Multimere werden freigesetzt. Durch den Blutfluss werden die noch globulären ULVWF-Multimere fadenförmig auseinander gezogen und haften an der luminalen Seite der Endothelzellschicht. An diese ULVWF-Multimere binden sofort Thrombozyten mittels Glykoprotein Ib und

werden aktiviert. Dadurch gelangt P-Selektin an die Oberfläche und kann dort an PSGL-1, einen Liganden der Monozyten, binden. Die adhärenen Monozyten interagieren mittels CD40 erst mit dem CD40L von auf ULVWF-Multimeren haftenden Thrombozyten und anschließend mit dem CD40L von Endothelzellen. Die CD40-CD40L-Interaktionen mit den Endothelzellen und Thrombozyten aktivieren zusätzlich die Monozyten und erleichtern die entweder parazelluläre oder transzelluläre Diapedese durch die Endothelzellschicht (Wagner *et al.*, 2004).

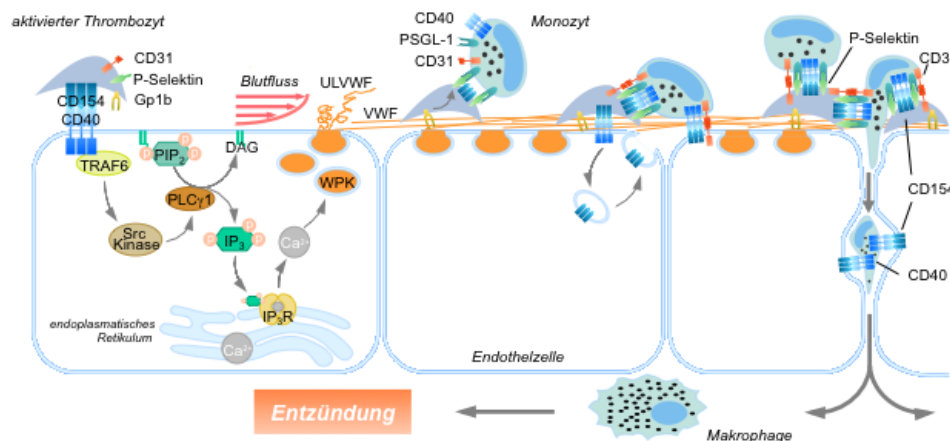


Abbildung 5: ULVWF- und Thrombozyten-vermittelte Monozyten-Endothelzellen-Interaktion

Die Abbildung zeigt wie aktivierte Thrombozyten durch CD40-CD40L Interaktion die vWF-Ausschüttung auslösen, Thrombozyten an die ULVWF-Multimere binden, Monozyten über die Thrombozyten bedeckten ULVWF-Multimere mit Endothelzellen interagieren und durch diese einlagige Zellschicht transmigrieren. Durch diese Interaktionen aktivierte Monozyten differenzieren danach im subendothelialen Gefäßgewebe zu Makrophagen und beeinflussen die lokale Entzündungsreaktion (Abbildung modifiziert nach (Wagner *et al.*, 2014))

1.3. Arteriogenese

Arteriogenese bezeichnet die Weitung des Gefäßdurchmessers von kleinen, bestehenden Arteriolen hin zu vollwertigen kollateralen Arterien. Sie ist abzugrenzen von der Angiogenese, der Neubildung von Blutgefäßen. Arteriogenese tritt häufig zusammen mit einer progredienten Ischämie, d.h. einer Minderdurchblutung mit Sauerstoffmangel, im betroffenen Gewebe auf. Auslöser kann ein Thrombus und in Folge dessen ein vollständiger Gefäßverschluss (Okklusion) sein. Aber auch schon eine höhergradige Gefäßverengung durch einen atherosklerotischen Plaque (> 70 % des normalen Gefäßlumens) kann eine Ischämie auslösen. Der Prozess der Arteriogenese wird durch Schubspannung ausgelöst, die aufgrund des erhöhten Blutflusses in der Stenose oder in Kollateralen zu dem von der Okklusion betroffenen Gefäß auftreten. Die erhöhten Scherkräfte führen zur Aktivierung und Proliferation von Endothelzellen. Chemokine wie MCP-1 und Zelladhäsionsmoleküle wie ICAM-1

und VCAM-1 werden vermehrt exprimiert. Dadurch werden Monozyten angelockt, können an Endothelzellen binden und in die Gefäßwand einwandern. Dort setzen diese Zellen die zur Gefäßerweiterung nötigen Wachstumsfaktoren und MMP frei. Zusätzlich zu den Endothelzellen teilen sich letztlich auch die SMCs (van Royen *et al.*, 2009). Hat sich der Gefäßdurchmesser genügend erweitert, so sinken der Blutfluss und mit ihm die Scherkräfte wieder auf ein normales Niveau. Sowohl bei der Arteriogenese als auch bei der Atherosklerose handelt es sich also um Entzündungsreaktionen (Ivo *et al.*, 2003).

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Basierend auf publizierten Vorarbeiten zur Signaltransduktion der CD40-induzierten Freisetzung von vWF aus Endothelzellen (Möller *et al.*, 2015) und zur Rolle von CD40 und ADAMTS-13 in der vWF-vermittelten Endothelzell-Thrombozyten-Monozyten-Interaktion (Popa *et al.*, 2018) ist es Ziel dieses Projekts, den relativen Beitrag der CD40-CD40L-gesteuerten zellulären Interaktion für die Auslösung und/oder Aufrechterhaltung der Atherosklerose abzuschätzen.

Mithilfe eines transgenen ApoE-KO-Mausmodells zur konditionellen Depletion des CD40 Rezeptors in Endothelzellen soll untersucht werden, ob eine verminderte Monozytenrekrutierung die Bildung von Plaques völlig verhindert oder zumindest deutlich verlangsamt. Weil die Arteriogenese viele Merkmale mit der Atherosklerose teilt, soll auch dort der Einfluss von endotheliale CD40 auf die Monozytenrekrutierung untersucht werden.

Zusätzlicher Fokus dieser Arbeit sind Gefäßverzweigungen als Prädilektionsstellen für Atherosklerose. Mittels *in vivo*- und *ex vivo*-Perfusionssystemen soll zusätzlich untersucht werden, ob Monozyten an Gefäßverzweigungen aufgrund einer erhöhten endothelialen CD40-Expression an die Gefäßwand rekrutiert werden und infiltrieren.

Folgende Untersuchungen sollen im Rahmen dieses Projekts durchgeführt werden:

- **Charakterisierung der ApoE-KO Mauslinie mit induzierbarem endotheliale CD40-KO und Quantifizierung des Plaquewachstums:**
Klärung der Frage, ob endotheliales CD40 für die Initiation und Progression der Atherosklerose eine Rolle spielt.
- **Quantifizierung der Arteriogenese bei Mäusen mit induzierbarem endothelialen CD40-KO:**
Aufklärung der Rolle von endotheliale CD40 bei der Arteriogenese.
- **Quantifizierung der Monozytenrekrutierung in einem *in vitro*-Perfusionsmodell der Gefäßverzweigung:**
Analyse des Adhäsionsverhaltens von Monozyten an Prädilektionsstellen der Atherosklerose in einem Zellkulturmodell mit humanen Zellen.
- **Etablierung eines neuartigen *ex vivo*-Perfusionsmodells der Gefäßverzweigung und Quantifizierung der Monozytenrekrutierung:**
Analyse des Adhäsionsverhaltens von Monozyten an Prädilektionsstellen der Atherosklerose in einem *ex vivo*-Perfusionssystem mit Mausgefäßen.

2. Material

2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.1.1. Zellkultur

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Autoklav	5050 EL	Tuttnauer
Inkubator Zellkultur	Heracell VIOS 160i	ThermoScientific
Kühl- und Gefrierschrank	CNP 4313	Liebherr
Magnet für Isolation von Endothelzellen	120.29	Dynal Biotech
Mikroskop Zellkultur	Axiovert 25	Carl Zeiss
Sterilbank	HERAsafe	Heraeus Instruments
Wasserbad	Wasserbad E10	Dinkelberg analytics
Zentrifuge 151 mm Rotor	Universal 32	Hettich
Zentrifuge 187 mm Rotor	Megafuge 1.0	Heraeus Instruments
Zentrifuge 87 mm Rotor mit Kühlung	Mikro 22 R	Hettich Zentrifugen

Verbrauchsmaterial	Bestellnummer	Hersteller
DMEM	21885-025	Gibco
Dynabeads, Schaf gegen Ratte IgG	110.35	Invitrogen
Endothelmedium	C-22210	Promocell
HUVEC Medium	C22210	Promocell
Kabelbinder	ART000201	Van Egmond Groep
Zellkulturschale, 10 cm	83.3902	Sarstedt
Zellschaber	83.1830	Sarstedt

2.1.2. Tierraum

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Infrarot Thermometer-Pistole	IR 900-30S	VOLTCRAFT
Käfiganlage Mäuse	GM500 DGM	Tecniplast S.P.A.
Kamera (für Tierraum Mikroskop)	IXUS 85 IS	Canon Digital
Operationsmikroskop	Leica Wild M650	Leica
PeriCam (für Blutflussmessung)	PeriCam PSI High Resolution System	Perimed Instruments
Plattform für Ligatur von	-	Selbst gebaut in

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Mausohrarterien		Heidelberg
Rasierapparat	Isis GT 420	B. Braun Aesculap
Rollenpumpe	REGLO Analog MS-4/6-100	Ismatec Labortechnik
Sauerstoffanreicherer	EverFlow	Philips Respironics
Schallköpfe	MS550 & MS700	FUJIFILM VisualSonics
Ultraschallgerät	Vevo 2100	FUJIFILM VisualSonics
Ultraschallperipherie: Schienensystem, Wärmeplatte mit Elektroden, 3D Motor	Vevo Imaging Station	FUJIFILM VisualSonics
Verdampfer (Isofluran)	UniVet Porta	Groppler Medizintechnik
Wärmelampe	Incandescent 230 V Par38E 10461	Philips

Verbrauchsmaterial	Bestellnummer	Hersteller
1 ml Spritze	303172	BD Plastipak
25 G Safety-Multifly-Kanüle	85.1642.235	Sarstedt
25 G SurGuard 2 Safety Needle	SG2+2525	Terumo
Antiseptikum Kodan Tinktur forte	104012	Schülke & Mayr
Bepanthen Feuchtigkeitscreme	81552983	Bayer
Einstreu für Mäuse	LTE E-002	Abedd
Enthaarungscreme	8218535	Veet RB Healthcare
Futter für Mäuse	Rod 18-A	Lasvendi
Gleitgel (Analsonde)	57-05	Parker MDSS
Kapillaren	GB 100F-10	Science Products
Klebeband für Tiere	1527-1	Transpore 3M
Kohlefilter Omincon flair (für Isofluran)	80120	Bickford Lab Technologies
Safety-Multifly 21G	85.1638.235	Sarstedt
Skintact ECG Gel (Elektrodengel)	58322	Leonhard Lang
Sterilfilter	FP 30/0.2 CA-S	Whatman
Ultraschallgel	848451	Diagramm Halbach

2.1.3. Molekularbiologie und Proteinbiochemie

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
-80 °C Gefrierschrank	Vip-series	Sanyo
Agarose Gelstation	Power Pack 25	Biometra
Gelilluminator	Gel Doc XR+	Biorad

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Mikrotiterplatten-Lesegerät ELISA Reader	PowerWave XS	BioTek
Mikrowelle	MS 28 F 301 TFS	Samsung
NanoDrop	NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientif
PCR Geräte	RotorGene Q Primus 96 advanced	Qiagen PeQLab
Proberöhrchen-Rotator	Intelli-Mixer RM-2L	ELMI
SDS-Page Gelstation	Power Pack Basic	Biorad
WB-Illuminator	ImageQuant LAS 4000 mini	GE Healthcare

Verbrauchsmaterial	Bestellnummer	Hersteller
Luminata Classico / Forte für WB	WBLUF0500	Milipore
Mikrotiterplatte 96 Well	655180	Cellstar
Omniscript RT Kit	205113	Quiagen
Reaktionsgefäß 1,5 ml	72.699	Sarstedt
RNeasy Mini Kit	74106	Quiagen

2.1.4. Histologie

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Cryotom	Microtom Cryostat HM 500 OM	Microm
Elektrisch beheizte Pinzette	Leica EG F	Leica Biosystems
Gelwärmer	Gel Warmer 82-03-20 CE	Parker Thermasonic
Heiz- und Rührplatte	MR2002	Heidolph
Kühlgerät (Paraffinblöcke)	Leica EG 1140C	Leica Biosystems
Laborabzug (Histologie)	Abzug B120	Laborbau Grittmann
Mikrotom	Leica RM2124 RTS	Leica Biosystems
Orbitalrührer	WT12	Biometra
Paraffin Schmelzer und Gießer	Leica EG 1120	Leica Biosystems
pH Messgerät	WTW Series pH 720	inoLab
Scanner (für Histologie)	Scanjet G4050	HP
Ultraschall Homogenisator	UP200H	hielscher Ultrasound Technology

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
(Sonikator)		
Vortexmischer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waagen	EW 820-2NM PFB 600-2M BP121S	Kern Kern Sartorius
Wärmeschrank	U10	Memmert
Wärmeschrank (Paraffin)	UN30pa	Memmert

Verbrauchsmaterial	Bestellnummer	Hersteller
DAB Enhanced Liquid Substrate System for Immunohistochemistry	D 3939	Sigma
Deckglas 15 mm	10474379	Thermo Scientific
DPBS -/-	14190-094	Gibco
Filterpapier	FT-4-207-125	Sartorius stedim
Gefriereinbettmedium	14020108926	Leica
Mowiol	475904	Cal Biochem
Objektträger	AAAA000001##12E	Thermo Scientific
Objektträger für Gefrierschnitte	J3800AMNZ	Thermo Scientific
PAP Pen (Fettstift)	1393	Kisker Biotech
Paraffin Paraplast plus	39602004	Leica
Plastikschalen (für Kryotom)	4566	Sakura

2.1.5. ibidi-Perfusion

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Heizsystem ibidi	Ibidi Temperature Controller, Heated Plate for 1 chamber in Multi-Well Format, Heated Glass Lid, Heating inserts for slides	ibidi
Ibidi Perfusionsystem	ibidi Pump Fluidic Unit Perfusion Set Heating Insert	ibidi
Inkubator (S2)	Water-Jacketed Incubator 3250	Forma Scientific
Inkubator / Wärmekasten (ibidi)	Innova CO-48	New Brunswick Scientific
Kamera ibidi	PixelFly PCO	PCO
Kipptisch (ibidi)	-	Selbst gebaut in Heidelberg
MACS Multistand Midi	019347	Miltenyi

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
MACS Magnet für Isolation von Monozyten		
Mikroskop mit Lampe	Axiovert 100 X-Cite 120PC, 120 W Halogen-Metalldampfampe	Carl Zeiss Visitron Systems GmbH

Verbrauchsmaterial	Bestellnummer	Hersteller
Citrat-Röhrchen	02.1067.001	Sarstedt
EDTA-Röhrchen	02.1066.001	Sarstedt
Leucosep-Röhrchen	227290	Greiner bio-one
LS-columns	130-042-401	Miltenyi Biotec
Pan Monocyte Isolation Kit, human	130-096-573	Miltenyi
Pancoll 1.077 g/ml human	P04-60500	PAN Biotech

2.1.6. Gefäßperfusion

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Druck-Pumpe	-	DMT
Inkubator (Perfusionsanlage)	Innova CO-48	New Brunswick Scientific
Konfokales Mikroskop	IX81	Olympus
Mikropipetten-Puller	P-87 Flaming/Brown Micropipette Puller	Sutter Instrument
Perfusionsplattform	-	Selbst gebaut in München

Verbrauchsmaterial	Bestellnummer	Hersteller
11-0 Nahtmaterial Nylon Black	03170/03146	S&T
Dreiwegehahn	394602	BD Connecta
Mikrotiterplatte 24 Well	83.3922	Sarstedt
Monocyte Isolation Kit (BM), mouse	130-100-629	Miltenyi
Schlauch für Perfusion	Tygon 3350	Tygon
Zellsieb, 40µm	431750	Corning

2.2. Operationsbesteck

Operationsbesteck	Bestellnummer	Hersteller
Mikropinzette	11251-20 Inox 5	FST by Dumont Swiss

Operationsbesteck	Bestellnummer	Hersteller
Mikroschere	Dosch 23	Geuder
Pinzette	11006-12	FST
Schere	14061-11	FST

2.3. Puffer-, Fixations- und Färbelösungen

Tabelle 1: Monozytenpuffer für Isolation muriner Monozyten

Monozytenpuffer	Menge für 50 ml
0,5 % w/v BSA	250 mg
2 mM EDTA	500 µl 0,2 M
H ₂ O	ad 50 ml

Tabelle 2: Thrombozytenpuffer für Isolation muriner Thrombozyten

Thrombozytenpuffer	Menge für 100 ml
138 mM NaCl	806 mg
2,7 mM KCl	20 mg
12 mM NaHCO ₃	100 mg
0,9 mM NaH ₂ PO ₄	6 mg
1 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O	20 mg
5 mM D-Glucose	90 mg
5 mM Hepes	120 mg
H ₂ O	ad 100 ml

Tabelle 3: DispaseLösung für HUVEC Präparation

DispaseLösung	Menge für 1,6 l
0,3125 % w/v Dispase	5 g
DPBS ohne Ca/Mg	1,6 l

Tabelle 4: DNA-Lysis-Puffer für DNA-Extraktion

DNA-Lysis-Puffer	Menge für 100 ml
100 mM Tris-HCl pH 8,5	10 ml 1 M
200 mM NaCl	1,2 g
5 mM EDTA	2,5 ml 0,2 M
0,2 % v/v SDS	200 µl 10 %
H ₂ O	ad 100 ml

Tabelle 5: TE-Puffer für DNA-Aufbewahrung nach Extraktion

TE-Puffer	Menge für 100 ml
10 mM Tris-HCl pH 8	1 ml 1 M
1 mM EDTA	0,5 ml 0,2 M
H ₂ O	ad 100 ml

Tabelle 6: Gelatine für Zellkultur

2 % Gelatine	Menge für 2 l
2 % w/v Gelatine Typ B	40 g
0,1 M HCl	200 ml 1 M
H ₂ O	1'800 ml

Tabelle 7: Kollagen für Zellkultur

50 µg/ml Kollagen	Menge für 60 ml
50 µg/ml Kollagen	1ml von 3 mg/ml Stocklösung
0,01 M HCl	60 ml

Tabelle 8: EC-Medium für Endothelzellisolation und -kultivierung

EC-Medium	Menge für 100 ml
0,35 % w/v Glucose	350 mg
0,4 % v/v ECGS/H	400 µl
20 % v/v FCS	20 ml 100 %
1 % v/v Pen/Strep	1 ml 100 %
1x nicht essentielle Aminosäuren	1 ml 100x
1 mM Natrium-Pyruvat	1 ml 100 mM
DMEM mit wenig Glucose	77 ml

Tabelle 9: Kollagenase A Lösung für Endothelzellisolation

Kollagenase A Lösung	Menge für 20 ml
0,1 % w/v Kollagenase A	20 mg
1.25 mM CaCl ₂	25 µl 1 M
1 % v/v Pen/Strep	200 µl 100 %
PBS	20 ml 1x

Tabelle 10: Trypsin/EDTA für Zellkultur

Trypsin/EDTA	Menge für 1 l
0,05 % w/v Trypsin	0,5 g
0,02 % w/v EDTA	0,2 g
H ₂ O	1 l

Tabelle 11: Allgemeiner PCR-Ansatz

PCR Ansatz	Menge für 50 µl
1x Puffer	5 µl 10x
0,2 mM dNTPs	1 µl 10 mM
0,4 µM Vorwärtsprimer	2 µl 10 pmol/µl
0,4 µM Rückwärtsprimer	2 µl 10 pmol/µl
1 U Taq-Polymerase	0,2 µl 5 U/µl
H ₂ O	34,8 µl
1 ng/µl cDNA	5 µl 10 ng/µl

Tabelle 12: Tris-HCl Puffer pH 7,4 / 8,5 für Histologie oder DNA-Extraktion

Tris-HCl Puffer pH 7,4 oder 8,5	Menge für 1 l
1 M Tris	121 g
HCl	Soviel bis pH = 7,4 oder 8,5
H ₂ O	ad 1 l

Tabelle 13: Homopuffer I (2x) Stock

Homopuffer I (2x) Stock	Menge für 50 ml
100 mM Tris-HCl pH 7.4	5 ml 1M
2,3 % w/v KCl	1150 mg
2 mM EDTA	500 µl 0,2 M
10 mM Glucose	100 mg
H ₂ O	ad 50 ml

Tabelle 14: Proteinase Inhibitor Mix für Homopuffer I (2x) Arbeitslösung

Proteinase Inhibitor Mix (PIM)
1 mg Pepstatin A in 200 µl DMSO und 800 µl 15 mM Hepes pH 7,4 lösen
1 mg Leupeptin in 200 µl DMSO und 800 µl 15 mM Hepes pH 7,4 lösen
Pepstatin A und Leupeptin zu gleichen Teilen mischen, bei -20 °C lagern

Tabelle 15: Homopuffer I (2x) Arbeitslösung

Homopuffer I (2x) Arbeitslösung	Menge für 500 µl
Homopuffer I (2x) Stock	485 µl
0,2 mM DTT	1 µl 0,1 M
0,16 mg/ml Pefabloc	2 µl 40 mg/ml
2,4 % v/v PIM	12 µl

Tabelle 16: Trenngel für WB

Trenngel 10 %	Menge für 1 Gel (5 ml)
H ₂ O	1,2 ml
0,4 M Tris-HCl pH 8,8	2 ml 1 M
10 % v/v Acrylamid	1,7 ml 30 %
1 % v/v SDS	50 µl 10 %
1 % v/v APS	50 µl 10 %
0,06 % v/v TEMED	3 µl 1x

Tabelle 17: Sammelgel für WB

Sammelgel 4 %	Menge für 1 Gel (1,5 ml)
H ₂ O	1,1 ml
0,125 M Tris-HCl pH 6,8	188 µl 1 M
4 % Acrylamid	200 µl 30 %
1 % v/v SDS	15 µl 10 %
1 % v/v APS	15 µl 10 %
0,1 % v/v TEMED	1,5 µl 1x

Tabelle 18: PBS-Puffer für Histologie

PBS Puffer	Menge für 1 l
137 mM NaCl	8g
2,7 mM KCl	0,2 g
10 mM Na ₂ HPO ₄	1,42 g
1,8 mM KH ₂ PO ₄	0,24 g
H ₂ O	Auf 1 l auffüllen, nachdem pH mit HCl auf 7,4 eingestellt wurde

Tabelle 19: TBS Puffer für WB und Histologie

10x TBS	Menge
0,5 M Tris	121,1 g
1,5 M NaCl	175,32 g
H ₂ O	Auf 2 l auffüllen, nachdem pH mit HCl auf 7,5 eingestellt wurde

Tabelle 20: TBS-T Puffer für WB und Histologie

1x TBS-T	Menge für 1 l
TBS	1l 1x
0,05 % v/v Tween-20	0,5 ml

Tabelle 21: Protein Laufpuffer für WB

10x Protein-Laufpuffer	Menge für 2 l
248 mM Tris	60 g
1,92 M Glycin	288 g
35 mM SDS	20 g
H ₂ O	Auf 2 l auffüllen, nachdem pH mit HCl auf 8,3 eingestellt wurde

Tabelle 22: Transferpuffer für WB

10x Protein-Transferpuffer	Menge für 2 l
248 mM Tris	60 g
1,92 M Glycin	288 g
H ₂ O	Auf 2 l auffüllen, nachdem pH mit HCl auf 8,3 eingestellt wurde

Tabelle 23: Blockpuffer für WB

Blockpuffer	Menge für 100 ml
5 % w/v Magermilchpulver	5 g
TBS-T	100 ml 1x

Tabelle 24: Blockpuffer für Histologie

Blockpuffer	Menge für 100ml
0,02 % v/v Tween20	20 µl 1x
2 % w/v BSA	2 g
5 % v/v Glycerin	5 ml 1x
0,03 % v/v Natriumazid	300 µl 10 %
PBS	ad 100 ml

Tabelle 25: ORO-Stocklösung

ORO-Stocklösung	Menge für 100 ml
0,2 % w/v ORO-Pulver	200 mg
Methanol	ad 100 ml

Tabelle 26: ORO-Arbeitslösung

ORO-Arbeitslösung	Menge für 45 ml
78 % v/v ORO-Stocklösung	35 ml
22 % v/v 1 M Natronlauge	10 ml 1 M
Arbeitslösung jeweils frisch ansetzen und vor Gebrauch filtrieren.	

Tabelle 27: Zink-Fixationslösung für Histologie und Gefäßfixierung

Zink-Fixationslösung	Menge für 1 l
0,1 M Tris-HCl pH 7,4	100 ml 1M
0,05 % w/v Calcium Acetat	0,5 g
0,5 % w/v Zinkacetat	5 g
0,5 % w/v Zinkchlorid	5 g
H ₂ O	ad 1 l

Tabelle 28: Methanol-Fixierlösung für Gefäßfixierung

Methanol-Fixierlösung	Menge für 100 ml
80 % v/v Methanol	80 ml
20 % v/v DMSO	20 ml

Tabelle 29: Formalin-Fixierlösung für Gefäßfixierung

Formalin-Fixierlösung	Menge für 100 ml
3.7 % v/v Formaldehyd	10 ml 37 %
PBS	90 ml

Tabelle 30: HEPES-Tyrode Puffer für Thrombozyten- und Erythrozytenisolation

HEPES-Tyrode Puffer	Menge für 1l
135 mM NaCl	7,88 g
2,8 mM KCl	0,21 g
2 mM CaCl ₂	0,22 g
1 mM MgCl ₂	0,1 g
0,4 mM NaH ₂ PO ₄	0,05 g
12 mM NaHCO ₃	1,01 g
6 mM HEPES	1,43 g
5,5 mM Glucose	0,99 g
0,35 % w/v BSA	3,5 g
H ₂ O	Auf 1 l auffüllen, nachdem pH mit HCl auf 7,35 eingestellt wurde

Tabelle 31: MACS Puffer für Monozytenisolation

MACS-Puffer	Menge für 50 ml
0,5 w/v % BSA	250 mg
2 mM EDTA	500 µl 0,2 M
PBS	ad 50 ml

Tabelle 32: PBS-TD für Gefäßfärbung

PBS-TD	Menge für 50 ml
1 % v/v Tween20	0,5 ml
1 % v/v DMSO	0,5 ml
PBS	49 ml

Tabelle 33: Blockierlösung für Gefäßfärbung

Blockierlösung	Menge für 12 ml
0,1 M Glycin	0,09 g
0,5 % w/v Casein	0,06 g
2 % v/v Serum	0,24 ml
PBS-TD	ad 12 ml

2.4. Software

Software	Versionsnummer	Hersteller
Excel	Mac 2011, 14.1.0	Microsoft
Fiji / ImageJ	1.51u	Wayne Rasband
Ibidi Kamera: VisiView, Visitron Systems GmbH, Puchheim	2.1.4	Visitron
Ibidi Pumpe Pump Control	1.5.2	ibidi
Konfokal Mikroskop xcellence rt	2.0 (build 4768)	Olympus soft image solutions
MoasicJ, Fiji-Plugin	July 6, 2011	P.Thévemaz, M. Unser
PIMSoft (PSI System)	1.5.4.8078	Perimed
Scanner (für ORO Aufnahmen)	2013	HP Scansoftware
Ultraschall Vevo 2100	1.2	VisualSonics

2.5. Antikörper und Farbstoffe

Antikörper / Farbstoff	Bestellnummer	Hersteller
Calcein Green	C34852	Invitrogen
CD31 JC70A, Maus, monoklonal (für Endothelfärbung)	M0823	Dako
CD31 MEC 13.3, Ratte, monoklonal (für Dynabeads)	sc-18916	Santa Cruz
CD40 C-20, Kaninchen, polyklonal	sc975	Santa Cruz
CellTracker Red	C34552	Invitrogen
DAPI (für Kernfärbung)	D1306	Invitrogen
F4/80, Ratte, monoklonal (für Makrophagen- und Monozytenfärbung)	T-2028	Dianova
HRP-Sekundärantikörper vs. Maus (für WB)	A4416	Sigma-Aldrich
HRP-Sekundärantikörper vs. Ratte (für WB)	A6154	Sigma-Aldrich
NucBlue (für Kernfärbung)	R37605	Life Technologies
ORO-Pulver	O0625-25G	Sigma-Aldrich
Rote Künstlerfarbe für Partikelperfusion	HKS 318 Bordeaux	Schminke
Sekundärantikörper Cy3 vs. Kaninchen	711-166-152	Dianova
Sekundärantikörper Cy3 vs. Maus	715-166-150	Dianova
Sekundärantikörper Cy3 vs. Ratte	712-166-150	Dianova
Sekundärantikörper Cy3 vs. Ziege	705-166-147	Dianova
Sekundärantikörper Cy5 vs. Kaninchen	711-606-152	Dianova

Antikörper / Farbstoff	Bestellnummer	Hersteller
Sekundärantikörper Cy5 vs. Maus	715-606-150	Dianova
Sekundärantikörper Cy5 vs. Ratte	712-606-150	Dianova
Sekundärantikörper Cy5 vs. Ziege	705-606-147	Dianova
Sekundärantikörper Daylight vs. Kaninchen	711-475-152	Dianova
vWF H-300, Kaninchen, polyklonal	Sc-14014	Santa Cruz
vWF, Kaninchen, polyklonal für ULVWF-Multimer-Färbung	A0082	Dako

2.6. Primer

Primer	Sequenz 5' → 3'	Temp. Primer-hybridisierung, Anzahl Zyklen
ADAMTS-13 globaler KO	oIMR8008: AGC CCC AAC TCT TGT CTT TTA AT oIMR8009: GAG TTG CTA GGT TAT CAG GAA G oIMR8010: TGG TTC TAA GTA CTG TGG TTT CC	56 °C, 35
ApoE globaler KO	oIMR0180: GCC TAG CCG AGG GAG AGC CG oIMR0181: TGT GAC TTG GGA GCT CTG CAG C oIMR0182: GCC GCC CCG ACT GCA TCT	67,7 °C, 35
CD40 globaler KO	oIMR0157: TCG TCC TGC AGT TCA TTC AG oIMR0692: GGC AGT AAG ACG ATG TGA CAA CAG AG oIMR0694: GAG ATG AGA AGG AAG AAT GGG AAA AC	67,7 °C, 35

Primer	Sequenz 5' → 3'	Temp. Primer-hybridisierung, Anzahl Zyklen
CD40 induzierbarer KO	mCD40AWa2_301_for: ACT GTC TGT ACC TGT AAG mCD40AWa2_516_rev: CAA GTT CTT ATC CTC ACA mCD40flxEX8_rev: TTA TCC TTT GGT TTC TTG A mCD40flxEX9_rev: ATA ATC TTC CAT CTC CTG	50 °C, 40
GAPDH	GAPDH-F: GAC CAC AGT CCA TGC CAT CAC TGC GAPDH-R: ATG ACC TTG CCC ACA GCC TTG G	60 °C, 30
vWF globaler KO	oIMR2084: AGT GAG ACC TTT GGC TTT GC oIMR3006: CCC AAC TTT TGC CAA CAA ATA oIMR6218: CCT TCT ATC GCC TTC TTG ACG	58 °C, 40

2.7. Chemikalien und Enzyme

Chemikalie	Bestellnummer	Hersteller
Accutase	A6964	Sigma-Aldrich
Agarose	A9539	Sigma-Aldrich
Apyrase 0.1 U/μl	A6535	Sigma-Aldrich
Benzylalkohol	620-8	Sigma-Aldrich
Benzylbenzoat	B6630	Sigma-Aldrich
Breadford Reagenz	500-0006	Biorad
BSA	8076.2	Roth
CaCl ₂	2386	Merck
D-Glucose	8337.1000	Merck
Dispase 2%	17105-041	Gibco
DMSO	D/4121/PB15	Fisher Chemical
dNTPs	110011	Bioron
ECGS/H	C-30120	Promocell
Ethanol	32205-2.5L	Honeywell
FCS	10500-064	Gibco
Formalin / Formaldehyd	131328.1211	PanReac Appli Chem

Chemikalie	Bestellnummer	Hersteller
Fungizon	152900-18	Gibco
Glycine	G/080060	Fisher Chemical
H ₂ O ₂	1.07209.0250	Merck
Isofluran	HDG9623 / BE6501325	Baxter
Isopropanol	190764	Sigma-Aldrich
Kollagen	A1048301	Thermo Fisher
Kollagenase A	10103586001	Roche Diagnostics
Methanol	20847.307	VWR Chemicals
Miglyol	3274	Caelo
Natrium-Pyruvat	S8636-100ML	Sigma Life Science
Non-Essential Amino Acids	M7145	Sigma-Aldrich
Oil Red O-Pulver	1320-06-5	Sigma-Aldrich
Pen/Strep	15070-063	Gibco
PGE1 1nmol/μl	P5515	Sigma-Aldrich
Proteinase K	RPROTK-RO	Sigma-Aldrich
Tamoxifen	T5648-5G	Sigma-Aldrich
Taq-Polymerase	119010	Bioron
Trypsin EDTA	25300-540	Gibco

2.8. Mauslinien

Tabelle 34: Verwendete Mauslinien und Lieferanten

Abkürzung	Bezeichnung	Lieferant und Liniennummer
WT	C57BL/6NCrl	Charles River, 027
ApoE-KO	B6.129P2-ApoE/tm1/Unc/J	Jackson Laboratory, 002052
vWF-KO	B6.129S2-Vwf tm1Wgr/J	Jackson Laboratory, 003795
CD40-KO	B6.129P2-Cd40tm1Kik/J	Jackson Laboratory, 002928
Induzierbarer endothelialer CD40-KO	B6.E14-J-TgH(CD40/flx/flx)RK x B6.129S4-GT(ROSA)26Sor tm1(FLP1)Dym/Rain x TgN(Tie2CreERT2)1399Gsc	Eigenzucht
Induzierbarer endothelialer CD40-KO mit ApoE-KO Hintergrund	B6.E14-J-TgH(CD40/flx/flx)RK x B6.129S4-GT(ROSA)26Sor tm1(FLP1)Dym/Rain x TgN(Tie2CreERT2)1399Gsc x B6.129P2-ApoE/tm1/Unc/J	Eigenzucht

Die Mauslinien mit induzierbarem endotheliale CD40-KO (CD40^{flox/flox} x Tie2-CreERT2) verfügen über eine Cre-Rekombinase (Cre) die an einen mutierten Östrogenrezeptor (ERT2) gebunden ist. Dadurch kann die Rekombinase nur in den Zellkern gelangen und Teile des mit loxP-Stellen flankierten CD40 Gens (CD40^{flox/flox}) ausschneiden, wenn der Maus Tamoxifen verabreicht wird. Um den Knockout nur in Endothelzellen zu aktivieren, unterliegt die Cre-Rekombinase der Kontrolle eines endothelspezifischen Tie2-Promoters.

3. Methoden

3.1. Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer Sterilsicherheitswerkbank. Das gesamte Arbeitsmaterial in der Sterilbank wurde täglich durch UV-Bestrahlung während mindestens einer Stunde sterilisiert. Nachträglich in die Sterilbank transferiertes Material wurde vorher erst gründlich mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und unter Luftfeuchtigkeitssättigung. Zum Aufwärmen von Medien auf ca. 37 °C wurde ein Wasserbad verwendet. Die Separierung von Medium und Zellen erfolgte mit einer Tischzentrifuge.

3.1.1. HUVEC Präparation

Um eine gleichbleibende Qualität der HUVECs zu gewährleisten, erfolgte deren Präparation durch technische Mitarbeiterinnen der Abteilung. Dafür wurden in den Geburtsabteilungen von Krankenhäusern in Heidelberg Nabelschnüre gesammelt (genehmigter Ethikantrag S-182/2013). Zwischen Geburt und Verarbeitung wurden die Nabelschnüre maximal 24 Stunden bei 4 °C in einem sterilen Schraubbecher gelagert. Vor der Präparation wurden PBS mit 1 % Penicillin und Streptomycin, steriles Präparationsbesteck und die Nabelschnur in einem Trockenschrank während 30 Minuten auf 37 °C vorgewärmt. Die Nabelschnur wurde mit einer Kompresse von äußerlichen Blutresten befreit und an beiden Enden gekürzt, um potentiell verunreinigte Abschnitte zu entfernen. In jedes Ende der Nabelschnurvene wurde jeweils eine Metall-Kopfkanüle eingeführt und mit einem Kabelbinder befestigt. An die Kanülen wurde ein Dreiwegehahn montiert. In einer 20 ml Spritze wurde das vorgewärmte PBS aufgezogen, ein Sterilfilter aufgesetzt und an einen der Dreiwegehähne angeschlossen. Die Nabelschnur wurde zweimal mit PBS und anschließend einmal mit Luft perfundiert, um sämtliches PBS wieder zu entfernen. Mit der Spritze wurde 0,31 % Dispase-Lösung (Tabelle 3, Seite 29) in die Nabelschnur gegeben, bis diese gefüllt war. Der efferente Dreiwegehahn wurde daraufhin geschlossen und weiterhin Dispase-Lösung eingefüllt, bis die Vene sichtbar gedehnt war. Der afferente Dreiwegehahn wurde geschlossen, die Nabelschnur kurz von Hand massiert und danach nochmals mit weiterer Dispase-Lösung gefüllt. Während einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C lösten sich die Endothelzellen von der Gefäßwand. Während der Inkubationszeit wurde aus Reststücken der Nabelschnur die Arterie herauspräpariert, in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gegeben und für die Genotypisierung bezüglich Einzel-nukleotid-Polymorphismen weiterverwendet. Die Genotypisierung erfolgte wie in einer früheren Publikation des Labors beschrieben (Cattaruzza *et al.*, 2004).

Nach der Inkubationszeit wurde die Nabelschnur gründlich massiert, um die durch die Dispase gelockerten Endothelzellen endgültig von der Gefäßwand zu lösen. Die Dreiwegehähne wurden geöffnet und die Dispase-Endothelzell-Lösung in einem 50 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Nabelschnur wurde noch zweimal mit PBS nachgespült, massiert und der Ausfluss im 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 200 g bei RT zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in HUVEC-Medium aufgenommen und gemäß Pelletgröße auf eine oder mehrere zuvor mit Gelatine (Tabelle 6, Seite 30) beschichtete Petrischalen mit 60 mm Durchmesser ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Am folgenden Morgen wurden die Zellen gewaschen und ein Mediumwechsel vorgenommen. Weitere Mediumwechsel erfolgten alle zwei Tage bis die Zellen bei ungefähr 80 % Konfluenz passagiert oder bei 100 % Konfluenz für Experimente verwendet wurden. Konfluenz bezeichnet den Zustand, wenn adhärente Zellen die Oberfläche ihrer Kulturschale lückenlos bedecken und dadurch aufhören, sich zu teilen.

3.1.2. Isolierung von pulmonalen Endothelzellen aus der Mauslunge

Für die Isolierung von Endothelzellen wurden mit Antikörper koppelbare Magnetkügelchen, Schaf-gegen-Ratte IgG Dynabeads, verwendet. Vor ihrer Verwendung mussten diese gewaschen werden. Dazu wurden 30 µl Magnetkügelchenlösung in 1 ml PBS mit 0,1 % BSA in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß aufgenommen und 2 min lang an einen Magneten gehalten. Hierdurch wurden die Magnetkügelchen zurückgehalten und das Medium konnte ohne Verlust von den Magnetkügelchen entnommen werden. Die Magnetkügelchen wurden erneut in 1 ml PBS mit 0,1 % BSA aufgenommen und nochmals 2 min lang an den Magneten gehalten. Nach dem Verwerfen des Überstands wurden die nun gewaschenen Magnetkügelchen in 200 µl PBS mit 0,1 % BSA aufgenommen und 20 µl Ratte-gegen-Maus CD31 Antikörper zugegeben. Die Magnetkügelchen wurden während mindestens zwei Stunden oder über Nacht mit einem Proberöhrchen-Rotator im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Nach der Koppelung mit Antikörper wurden die Magnetkügelchen dreimal mit jeweils 1 ml DMEM mit 10 % FCS 2 min lang am Magneten gewaschen. Nach dem Waschen wurden sie in 250 µl DMEM mit 10 % FCS aufgenommen und bis zur Verwendung während maximal 24 Stunden im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Die entnommenen Mauslungen (Kapitel 3.2.3, Seite 45) wurden unter der Sterilbank in einer Petrischale mit einer sterilen Schere homogenisiert. Um genügend Zellmaterial zu erhalten, wurden pro Isolation die Lungen von jeweils zwei Mäusen verwendet. Das Gewebehomogenisat wurde in 15 ml frisch

angesetzter und sterilfiltrierter 0,1 % Kollagenase A Lösung (Tabelle 9, Seite 30) aufgenommen und in einem 15 ml Reaktionsgefäß während einer Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das Reaktionsgefäß mehrmals geschüttelt. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension durch ein 40 µm Zellsieb filtriert und mit 10 ml DMEM mit 10 % FCS nachgespült. Die Zellsuspension wurde 5 min lang bei 160 g zentrifugiert und das Zellpellet in 2 ml DMEM mit 10 % FCS resuspendiert. 250 µl CD31 gekoppelte Magnetkügelchen wurden dazugegeben und während 30 min auf einem Rotator im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die an die Magnetkügelchen gebundenen Zellen fünfmal mit jeweils 1 ml DMEM mit 10 % FCS 2 min lang am Magneten gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml DMEM ohne FCS 2 min lang am Magneten gewaschen. Es folgte die Trypsinierung, um die Zellen von den Magnetkügelchen zu lösen. Zum Trypsinieren wurden die an die Magnetkügelchen gebundenen Zellen in 150 µl Trypsin/EDTA (Tabelle 10, Seite 31) aufgenommen und während 5-10 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Während dem Trypsinieren wurde die Suspension mehrmals geschüttelt. Danach wurde 1 ml EC-Medium (Tabelle 8, Seite 30) zugegeben, um die Trypsinaktivität zu stoppen. Die Suspension wurde 2 min lang an den Magneten gehalten, das EC-Medium mit den abgelösten Zellen abgenommen und ausgesät. Die Magnetkügelchen wurden nach dem Abnehmen der Zellen auch in 1 ml EC-Medium aufgenommen und separat als Kontrolle auf jeweils einer Petrischale mit 35 mm Durchmesser ausgesät. Die Schalen wurden zuvor während mindestens einer Stunde bei 37 °C mit Gelatine beschichtet und mit PBS gewaschen. Erfolgte keine Trennung der Zellen von den Magnetkügelchen, so wurden die Zellen ohne Trypsinierung zusammen mit den Magnetkügelchen ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte danach in einem Inkubator bei 5 % CO₂ und 37 °C. Am Tag nach der Isolation wurde das Medium gewechselt, um die toten Zellen abzunehmen. Danach erfolgte alle drei Tage ein Mediumwechsel, bis die Zellen Konfluenz erreichten.

Erreichten die Zellen nach ca. zwei Wochen Konfluenz, wurden sie passagiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen in der Schale mit DMEM ohne FCS wurden 0,5 ml Accutase zugegeben. Verwendung von Accutase erfolgte, da es Zellen schonender als Trypsin ablöst. Die Zellen wurden bei RT mindestens 10 min mit Accutase inkubiert, bis sie sich ablösten. Das Überprüfen der Ablösung erfolgte unter dem Mikroskop. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Probenröhrchen überführt und 5 min lang bei 160 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 7 ml EC-Medium resuspendiert und in einer, wie zuvor beschrieben mit Gelatine beschichteten Petrischale mit 100 mm Durchmesser ausgesät. Hatten die Zellen erneut Konfluenz erreicht, fand eine zweite Selektion statt.

Mit der zweiten Selektion sollten Verunreinigungen, wie z.B. Fibroblasten, entfernt werden. Wie bereits ausgeführt, wurden die Magnetkügelchen mit

CD31-Antikörper gekoppelt und gewaschen. Die Zellen in der Schale wurden zweimal mit DMEM ohne FCS gewaschen und mit 3-4 ml Accutase zum Ablösen der Zellen versetzt. Nach mindestens 10 min Inkubation bei RT zur Ablösung der Zellen wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 min lang bei 160 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml DMEM mit 10 % FCS resuspendiert, anschließend wurden 250 µl CD31 gekoppelte Magnetkügelchen zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf einem Rotator im Kühlschrank bei 4 °C wurde die Suspension 2 min lang an den Magneten gehalten. Der von Magnetkügelchen freie Überstand wurde als Negativkontrolle auf einer Gelatine beschichteten Petrischale mit 35 mm Durchmesser ausgesät. Die an die Magnetkügelchen gebundenen Zellen wurden viermal mit DMEM mit 10 % FCS 2 min lang am Magneten gewaschen. Anschließend wurden sie einmal mit DMEM ohne FCS 2 min lang am Magneten gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und 150 µl Trypsin/EDTA dazugegeben. Es folgte eine Inkubation der Suspension während 5-10 min im Wasserbad bei 37 °C zur Trennung von Zellen und Magnetkügelchen. Während der Inkubation wurde die Suspension mehrmals geschüttelt. Nach dem Inkubieren wurde 1 ml EC-Medium dazugegeben und die Suspension 2 min lang an den Magneten gehalten. Der die Zellen enthaltende Überstand wurde abgenommen und in einer mit Gelatine beschichteten Petrischale mit 35 mm Durchmesser ausgesät. Die Magnetkügelchen wurden ebenfalls in 1 ml EC-Medium aufgenommen und als Kontrolle in einer weiteren Petrischale ausgesät. Die Zellen wurden, wie zuvor beschrieben, bis zum Erreichen der Konfluenz im Inkubator belassen. War ein weiteres Passagieren nötig, erfolgte dies nach der bereits erwähnten Methode.

3.2. Handhabung von Labormäusen

3.2.1. Versuchstierhaltung

Arbeiten mit Versuchstieren erfolgten gemäß den ethisch und gesetzlich vorgeschriebenen Richtlinien in Deutschland. Die belastete ApoE-KO Mauslinie wurde gemäß dem durch das Regierungspräsidium Karlsruhe bewilligten Züchtungsantrag 35-9185.81/G75/14 gezüchtet. Die Entnahme von Organen und Blutgefäßen erfolgte nach Tötung gemäß der Anzeige für die Tötung von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken (gem. §1 und §4 Abs. 3 des Tierschutzgesetzes): T-25/14 (bis 31.12.17) und T-79/17 (ab 1.1.18). Die Tiere wurden unter keimarmen Bedingungen in der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) der Universität Heidelberg und im Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Universität Heidelberg gehalten. Dabei erhielten die Tiere Wasser und Futter *ad libitum*. Die Tierhaltung erfolgte bei einem 12 h Licht-Dunkelheit Zyklus, einer Raumtemperatur von 20-24 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45-65 % und einem 50-70 fachen Luftaustausch

pro Stunde. Verwendet wurden die in Tabelle 34, Seite 40 aufgeführten Mauslinien.

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde das durch die Nummerierung anfallende Ohrlochstanzenstück verwendet. Daraus wurde DNA extrahiert (Kapitel 3.3.2, Seite 50) und damit eine Genotypisierungs-PCR (Kapitel 3.1.1, Seite 41) mit den entsprechenden Primern (Kapitel 2.6, Seite 37) durchgeführt.

3.2.2. Tötung, Blutabnahme und Perfusion

Alle Versuchstiere wurden durch CO₂-Inhalation narkotisiert und getötet. Dies erfolgte durch langsames Einströmen von CO₂ in eine geschlossene Kammer. Nach dem Tod wurde die Maus gewogen und auf dem Rücken liegend mit Kanülen durch die Vorder- und Hinterbeine auf einer Silikonunterlage fixiert. Das Bauchfell wurde mit 70 % Ethanol benetzt, über dem Darmbereich mit einer Pinzette hochgehoben und mit einer Schere angeschnitten. Von Hand wurde das Fell *kranial* und *kaudal* weggezogen. Die Bauchdecke wurde auch über dem Darmbereich mit einer Pinzette hochgezogen und mit einer Schere angeschnitten. Der Einschnitt wurde auf beiden Seiten lateral-dorsal erweitert. Zur Blutabnahme wurde der Darm beiseitegeschoben bis die *Vena cava inferior* sichtbar wurde. Eine 25 G Kanüle mit Spritze, in der 100 µl 3,13 % Natriumcitrat gegen die Blutgerinnung aufgezoogen waren, wurde in die *Vena cava inferior* eingeführt und langsam das Blut abgenommen. Durch sanften, wiederholten Druck auf den Brustkorb über dem Herzen konnte weiteres Blut in die leer werdende Vene gepresst werden, was die Blutaussbeute verbesserte. Nach dem Öffnen von Fell und Bauchdecke sowie eventueller Blutabnahme wurde das Diaphragma aufgeschnitten, um das Herz freizulegen. Das Herz wurde mit einer mikrochirurgischen Pinzette am Apex festgehalten und der rechte Ventrikel eröffnet. In den linken Ventrikel wurde eine 25 G Butterfly-Kanüle eingeführt und mittels einer Rollpumpe wurden ca. 30 ml vorgewärmtes DMEM durch das Gefäßsystem gepumpt. Dadurch wurde jegliches, zumindest aber das arterielle Blut aus dem Kreislauf entfernt und ein Verklumpen des Blutes verhindert. Eine erfolgreiche Ausblutung ließ sich am aus dem rechten Ventrikel entweichenden Blut und der Entfärbung der Leber feststellen.

3.2.3. Organentnahme

Zur Entnahme von Lungen, Aorten, Karotiden und Karotisverzweigungen wurde die Maus gemäß Kapitel 3.2.2, Seite 45 vorbereitet. Das Brustbein und die Rippen wurden mit einer Schere entfernt, so dass die Luftröhre beim Übergang vom Hals- zum Brustbereich sichtbar wurde. Alle weiteren Prozeduren erfolgten unter Zuhilfenahme eines Operationmikroskops.

Die in der Brusthöhle liegenden Lungen wurden mit einer sterilen Mikroschere von den Bronchien abgetrennt und in eine Petrischale mit sterilem PBS gegeben, um etwaige äußerliche Blutreste abzuwaschen.

Zur vereinfachten Visualisierung beziehen sich die im folgenden Text erscheinenden Nummern auf die entsprechende Nummer in Abbildung 6, Seite 47. Die Aorta wurde unter Verwendung einer Mikroschere und einer Mikropinzette vom umliegenden Gewebe befreit. Dabei wurde die Aorta vom Herz (1) aus über den Aortenbogen (3) bis zur absteigenden Aorta (4) inklusive den drei Hauptabgängen im Aortenbogen (6,7,8) freigelegt. Die Abgänge wurden im Bereich ihrer nächsten Verzweigung durchgeschnitten, die Aorta jeweils beim Herzansatz und bevor sie sich in die Beckenarterien (5) auftrennte. Die Aorta wurde dann in eine Petrischale mit sterilem PBS gegeben.

Bei der Entnahme der Karotis (10) wurde nur der erste Abgang, *Truncus brachiocephalicus* (6), von seinem Ursprung bis zur Karotisverzweigung (11) in *Arteria carotis interna* (12) und *Arteria carotis externa* (13) freigelegt. Ein gerades, abzweigungsfreies Stück der *Arteria carotis communis* (10) zwischen der Karotisverzweigung und dem Abgang der *Arteria subclavia* (9) wurde entnommen und in eine Schale mit sterilem PBS gegeben.

Zur Entnahme der Karotisverzweigung wurde die *Arteria carotis communis* (10) vom Abgang der *Arteria subclavia* (9) bis zur Karotisverzweigung (11) und anschließend die *Arteria carotis interna* (12) und *externa* (13) von der Karotisverzweigung bis kurz nach ihrer jeweils nächsten größeren Verzweigung freigelegt. Alle kleineren Abzweigungen (14), vor allem im Bereich der Karotisverzweigung und kurz dahinter wurden mit zuvor vorbereiteten, aber noch nicht festgezogenen Knoten aus 11-0 Polyethylen Nahtmaterial abgebunden. Da Position und Anzahl der kleineren Abzweigungen zwischen den verschiedenen Mauslinien variierten, folgt hier nur eine ungefähre Beschreibung. In der Regel befand sich eine Abzweigung in der *Arteria carotis externa*, eine in der *Arteria carotis interna* und eine im Bereich der Karotisverzweigung selbst, oft aber auch verschoben hin zum Anfang der *Arteria carotis interna*. Nach dem Abbinden der kleineren Verzweigungen wurde die Karotisverzweigung entnommen. Dazu wurde die *Arteria carotis communis* direkt nach der *Arteria subclavia* Abzweigung, die *Arteria carotis interna* kurz nach dem nächsten größeren, abgebundenen, Abgang und die *Arteria carotis externa* direkt vor dem nächsten größeren Abgang durchtrennt. Die Karotisverzweigung wurde dann in eine Schale mit DMEM gegeben.

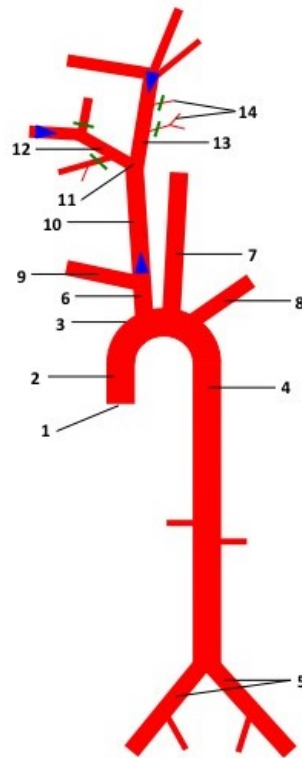


Abbildung 6: Skizze der Aorta und der Karotisverzweigung

Die Skizze zeigt den Verlauf der Aorta vom Herzen (1) durch die aufsteigende Aorta (*Aorta ascendens*) (2), den Aortenbogen (*Arcus aortae*) (3), die absteigende Aorta (*Aorta descendens*) (4) bis zur Verzweigung in die großen Beckenarterien (*Arteriae iliacae communes*) (5). Im Aortenbogen befinden sich die drei Abgänge *Truncus brachiocephalicus* (6), *Arteria carotis communis sinistra* (7) und *Arteria subclavia sinistra* (8). Der *Truncus brachiocephalicus* verzweigt sich in die *Arteria subclavia dextra* (9) und die *Arteria carotis communis dextra* (10). Die *Arteria carotis communis dextra* verzweigt sich in der Karotisverzweigung (11) in die *Arteria carotis interna* (12) und die *Arteria carotis externa* (13) die das Gehirn respektive das Gesicht mit Blut versorgt. Aus der *Arteria carotis interna* und *externa* können kleinere Verzweigungen (14) abgehen, deren Abbindungsstelle grün markiert ist. Die Stellen, wo die Kapillaren zur Gefäßverzweigungsperfusion eingeführt werden, sind mit blauen Dreiecken gekennzeichnet.

3.2.4. Isolierung von Thrombozyten aus Vollblut und Fluoreszenzfärbung

Die Blutentnahme erfolgte aus der *Vena cava inferior* (Kapitel 3.2.2, Seite 45). Das Blut (normalerweise 0,5-1 ml) wurde in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit Thrombozytenpuffer (Tabelle 2, Seite 29) mit 1 nmol/ml PGE1 auf 1,5 ml aufgefüllt und bei 150 g 5 min lang ohne Bremse zentrifugiert. Um eine Verunreinigung mit Erythrozyten zu vermeiden, wurden nur zwei Drittel des PRP abgenommen. Das übrige Drittel des PRP wurde in ein separates Reaktionsgefäß transferiert, auf 1,5 ml mit PGE1 enthaltendem Thrombozytenpuffer aufgefüllt und bei 150 g 5 min lang ohne Bremse zentrifugiert. Hiervon wurden wiederum zwei Drittel des PRP abgenommen, mit den ersten zwei Dritteln vereinigt und bei 150 g 5 min lang ohne Bremse zentrifugiert. War eine Färbung der Thrombozyten erforderlich, wurde das Thrombozytenpellet in 1 ml PGE1 enthaltendem Thrombozytenpuffer mit 5 µl Calcein Green aufgenommen

und während 30 min lichtgeschützt bei RT gefärbt. Danach wurden die Thrombozyten dreimal mit PGE1 enthaltendem Thrombozytenpuffer gewaschen und bei 450 g 10 min lang ohne Bremse zentrifugiert. Zum Schluss wurden die Thrombozyten in 200 µl Thrombozytenpuffer ohne PGE1 gelöst und im Inkubator bei 37 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.2.5. Isolierung von Monozyten aus Knochenmark und Fluoreszenzfärbung

Einer wie in Kapitel 3.2.2, Seite 45 vorbereiteten Maus wurden aus den Hinterbeinen Femur und Tibia entnommen. Sämtliche Fell-, Haut- und Muskelreste wurden von den Knochen abgeschabt. Die Epiphysis ossis wurde bei allen Knochen beidseitig mit einer Schere abgetrennt, um die Knochenmarkhöhlen freizulegen. Eine Darstellung des Knochens mit Epiphysen ist in Abbildung 7, Seite 48 zu sehen.

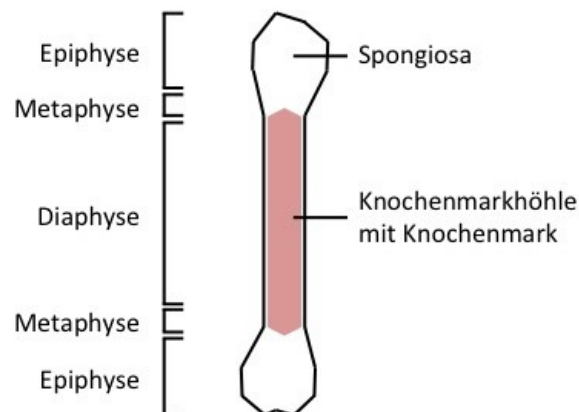


Abbildung 7: Röhrenknochen mit Knochenmark

Die Skizze zeigt einen Röhrenknochen, in dessen hohler Diaphyse sich das Knochenmark befindet. Die mit Knochenschwammsubstanz (*Substantia spongiosa*) gefüllte Epiphyse (*Epiphysis ossis*) bildet den Abschluss des Knochens auf beiden Seiten. Die Metaphyse ist bei ausgewachsenen Tieren der nicht scharf abgrenzbare Bereich zwischen Epiphyse und Diaphyse.

Mithilfe einer Spritze und einer 25 G Kanüle wurde das Knochenmark mit Monozytenpuffer (Tabelle 1, Seite 29) aus dem Röhrenknochen herausgespült. Das Knochenmark wurde durch ein 40 µm Zellsieb gesiebt und das Sieb mit ausreichend Monozytenpuffer nachgespült. Das gelöste Knochenmark wurde 10 min lang bei 300 g zentrifugiert, das Leukozytenpellet in Monozytenpuffer gelöst und die Zellanzahl mittels einer Zählkammer bestimmt. Ein Volumen, welches 10×10^7 Zellen entsprach, wurde weiterverwendet und die Monozyten mit einem Maus-Monozyten-Isolationskit und mittels magnetischer Zellseparation gemäß Herstellerprotokoll aus dem Leukozytengemisch aufgereinigt. Die Monozyten wurden nach Bestimmung der Monozytenanzahl in 1 ml Monozytenpuffer mit 5 µl Zellnachverfolgungsfarbstoff CellTracker Red aufgenommen und während 1 h bei 37 °C im Dunkeln im Inkubator gefärbt. Nach

dem Färben wurden die Monozyten zweimal mit Monozytenpuffer gewaschen und bei 300 g 10 min lang ohne Bremse zentrifugiert. Zum Schluss wurden die Monozyten in 200 µl Monozytenpuffer resuspendiert und im Inkubator bei 37 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.2.6. Endothelzell-spezifische CD40-Knockout-Maus

Zur Herstellung von Endothelzell-spezifischen CD40-Knockout-Mäuse ist in den Tie2-Cre transgenen Tieren eine Verabreichung von Tamoxifen notwendig. Unter einem Laborabzug wurde Tamoxifen abgewogen und in der Vehikelsubstanz Miglyol zu 20 mg/ml mit einem Vortexmischer gelöst. Unter dem Abzug wurden Spritzen mit einer 27 G Kanüle mit der Tamoxifen-Miglyol-Mischung befüllt. Dabei wurden pro Injektion 50 µl verabreicht. Eine Spritze wurde mit genügend Injektionslösung für mehrere Mäuse befüllt. Für Kontrolltiere wurden Spritzen nur mit Miglyol befüllt.

Die intraperitonealen Injektionen (1 mg Tamoxifen/50 µl Miglyol bzw. 50 µl Miglyol als Kontrolle einmal täglich während fünf Tagen) bei 10 Wochen alten Mäusen erfolgten im IBF durch geschulte Tierpfleger. Nach Verabreichung der letzten Spritze wurden die Mäuse zwei Wochen lang im IBF belassen, bevor sie weiterverwendet wurden. Diese Wartezeit war erforderlich, um dem als krebserregend eingestuften Tamoxifen Zeit zu geben, von den Mäusen ausgeschieden zu werden. Danach konnten aus diesen Tieren die Lungen extrahiert werden, um daraus die Endothelzellen zu isolieren und diese zu kultivieren. Aus den Endothelzellkulturen wurden RNA und Proteine isoliert, um damit PCRs, respektive Western Blots, durchzuführen.

3.3. Molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden

3.3.1. RNA-Extraktion

Zur Gewinnung von RNA aus Zellmaterial wurde das „RNeasy Mini“ Kit verwendet. Dafür wurden in einer Petrischale kultivierte Zellen erst zweimal mit PBS gewaschen und dann 346,5 µl RLT-Puffer aus dem Kit und 3,5 µl β-Mercaptoethanol auf die Zellen gegeben, um sie zu lysieren. Es wurden 350 µl Ethanol dazugegeben und das Gemisch gemäß Anleitung mit den Kieselsäuremembran-Zentrifugationsröhrchen des Kits aufgereinigt. Am Ende wurden die RNA mit 30 µl RNase freiem Wasser eluiert und die Proben sofort auf Eis gestellt. Bis zur Verwendung wurde die extrahierte RNA bei -80 °C gelagert.

3.3.2. DNA-Extraktion

Zur Genotypisierung von Mäusen oder HUVEC wurde jeweils DNA aus Mausohrlochstanzen oder Arterienstücken der Nabelschnur extrahiert. Das Gewebe wurde über Nacht bei 56 °C in 400 µl Lyse-Puffer (Tabelle 4, Seite 29) mit 5 µl Proteinase K unter leichter Agitation verdaut. Im Anschluss daran wurde die Probe mit einem Vortexmischer durchmischt, auf Eis abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Es wurden 300 µl Isopropanol hinzugegeben, durch Invertieren vermischt und während 5-15 min bei RT inkubiert. Die Probe wurde bei 35×10^3 g 5 min lang bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 500 µl 70 % Ethanol aufgenommen und wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl 100 % Ethanol eingebracht. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei 37 °C während 5-10 min trocknen gelassen. Auf das getrocknete Pellet wurden 50 µl TE-Puffer (Tabelle 5, Seite 30) gegeben und das Ganze bei 68 °C während 1-2 Stunden unter leichter Agitation gelöst. Danach wurde die Probe mit einem Vortexmischer durchmischt, kurz abzentrifugiert und kurzfristig bei 4 °C und langfristig bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.3.3. Konzentrationsbestimmung RNA und DNA

Zur Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA wurde der NanoDrop 1000 Spectrophotometer verwendet. 1-2 µl RNA- oder DNA-Lösung wurden auf den Messsockel des NanoDrops aufgetragen und im Softwaremenü Nukleinsäure ausgewählt. Beim Probentyp wurde für RNA „RNA-40“ ausgewählt und für die üblicherweise verwendete doppelsträngige DNA „DNA-50“. Der NanoDrop lieferte die RNA- und DNA-Konzentration in ng/µl, welche benutzt wurde, um die benötigte Einsatzmenge oder Verdünnung für die PCR zu berechnen.

3.3.4. cDNA-Synthese

Extrahierte RNA (Kapitel 3.3.1, Seite 49) wurde zur weiteren Verwendung zu cDNA umgeschrieben. Dafür wurde das „Omniscript RT Kit“-Kit verwendet. Mit der zuvor bestimmten RNA-Konzentration (Kapitel 3.3.3, Seite 50) wurde das entsprechende Volumen für 1.000 ng, (maximal 12 µl) abgemessen und gemäß der Kitanleitung mit der Reversen Transkriptase während 1 h bei 37 °C umgeschrieben. Das Produkt der Umschreibung wurde mit sterilem Wasser auf 100 µl aufgefüllt, so dass eine Konzentration von 10 ng/µl vorlag und die cDNA ohne weitere Verdünnung bei PCRs eingesetzt werden konnte. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20 °C eingefroren.

3.3.5. PCR

Umgeschriebene cDNA (Kapitel 3.3.4, Seite 50) wurde mithilfe eines PCR-Geräts vervielfältigt. Dafür wurden Taq Polymerase, dNTPs und Reaktionspuffer von Bioron verwendet. In einem 50 µl Ansatz wurden 50 ng cDNA gemäß Tabelle 11, Seite 31 verwendet. Bei einer PCR mit mehr als zwei Primern wurde das zusätzliche Primer-Volumen vom Wasser abgezogen. Das PCR Programm wurde jeweils individuell an die Primer und benötigte Vervielfältigung angepasst. So wurde im Primer-Hybridisierungsschritt die Temperatur dem jeweiligen Primerpaar angeglichen, die Elongationszeit der Produktlänge und die Anzahl Zyklen der benötigten Vervielfältigung. Ein typisches PCR-Programm hatte folgenden Aufbau: Das PCR-Gerät wurde auf 95 °C vorgeheizt, die Proben hineingegeben und 5 min lang bei 95 °C denaturiert. Danach folgten üblicherweise 30 Zyklen von 30 sec Denaturierung bei 95 °C, 30 sec Primerhybridisierung bei 58 °C und 60 sec Elongation bei 72 °C. Nach dem Durchlaufen aller Zyklen erfolgte ein finaler Elongationsschritt bei 72 °C während 5 min, die Maschine wurde auf 4 °C gekühlt und die PCR gestoppt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

3.3.6. Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese wurden vervielfältigte cDNA Proben (Kapitel 3.3.5, Seite 51) analysiert. Die Herstellung eines 1,5 % Agarosegel erfolgte, indem 1,5 g Agarose in 100 ml 0,5x TBS-Puffer (Tabelle 19, Seite 33) durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst wurden. Nach Abkühlen unter fließendem Wasser auf ca. 40 °C wurden 3 µl Ethidiumbromid dazugegeben. Das Agarosegel wurde unter einem Abzug in die Gelkammer gegossen und ein Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Nach 1 h Aushärten bei RT wurde das Gel mit 0,5x TBS-Puffer bedeckt und der Kamm herausgezogen, ohne dass Luftblasen in die Probenaschen kamen. Zu den 50 µl PCR-Produkt wurden 10 µl 10x Ladefarbstoff gegeben und 30 µl des Gemisches in eine Probenasche gefüllt. Abhängig von der berechneten Länge des PCR-Produktes wurde ein passender Größenmarker in eine der Probenasche gefüllt. Die Elektrophorese wurde gestartet und erfolgte während 10 min bei 80 Volt, um die Proben ins Gel einziehen zu lassen. Danach wurde die Spannung ca. 1 h lang auf 120 Volt gestellt, wobei die tatsächlich benötigte Zeit anhand der Laufbandenfront bestimmt werden konnte. Nach der Gelelektrophorese erfolgte die Analyse in einem Gel-Illuminator. Bei einer Wellenlänge von 302 nm wurde im Illuminator das in die PCR-Produkte eingelagerte Ethidiumbromid zum Leuchten gebracht. Aufnahmen des Gels wurden gemacht, ohne dass die eingestellte Belichtungszeit zu Übersättigung führte. Anhand der Banden des Größenmarkers konnte die Größe der PCR-Produkte bestimmt werden.

3.3.7. Aufarbeitung der Proben für die Proteinanalyse mittels Western Blot

Zur Gewinnung von Proteinproben aus Zellmaterial musste dieses lysiert werden. Dazu wurden in Petrischalen kultivierte Zellen erst zweimal mit kaltem PBS gewaschen und dann wiederholt mit jeweils 900 µl kaltem PBS und einem Zellschaber abgekratzt. Das PBS-Zellgemisch wurde in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß auf Eis transferiert und anschließend 3 min lang bei 900 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet je nach Zellmenge in 20-50 µl sterilem Wasser gelöst. Die Zellen wurden dann jeweils fünfmal abwechselnd in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem Heizblock bei 37 °C wieder aufgetaut. Das Probenvolumen wurde abgemessen und die gleiche Menge an Homopuffer I (2x) (Tabelle 15, Seite 32) dazugegeben. Das Gemisch wurde für 5 min lang bei 900 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand, d.h. das Gesamtlisat, abgetrennt und das Pellet verworfen. Das Gesamtlisat wurde entweder direkt weiterverwendet oder bei -20 °C eingefroren.

3.3.8. Proteinbestimmung nach Bradford

Ein Bradford-Test wurde verwendet, um die Proteinkonzentration des Gesamtlisats (Kapitel 3.3.7, Seite 52) zu bestimmen. Dazu wurde die Probe erst 1:50 mit Wasser verdünnt. Jeweils 200 µl des 1:5 mit Wasser verdünnten Bradford-Reagenz wurden in die Vertiefungen einer 96er Mikrotiterplatte mit Flachboden vorgelegt. Jeweils zweimal zur Doppelbestimmung wurden 80 µl Wasser, 80 µl der Standardreihe und 80 µl der verdünnten Probe in die Platte gegeben. Die Standardreihe bestand aus 5, 10, 15, 20 und 30 µg/ml BSA in Wasser. Die Platte wurde 10 min lang bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät ausgewertet. Anhand der Standardreihe und dem Verdünnungsfaktor der Proben konnte die Proteinkonzentration des Gesamtlisats bestimmt werden.

3.3.9. SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinproben (Kapitel 3.3.7, Seite 52) nach Molekülmasse wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Von den Proteinproben wurde das entsprechende Volumen für 10 µg Protein abgemessen und mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 6 µl 4x Probenpuffer wurde das Gemisch 5 min lang bei 95 °C aufgekocht. Nach dem Aufkochen wurden die Proben auf Eis ausgekühlt und anschließend vollständig in die Geltaschen eines zuvor vorbereiteten SDS-Polyacrylamid Gels mit einem 10 % Trenn- und 4 % Sammelgel (Tabelle 16, Seite 32 und Tabelle 17, Seite 32) gegeben. Leere Geltaschen wurden mit 10-15 µl 1x Probenpuffer gefüllt. Die Innenseite der Gelkammer war dabei vollständig mit Proteinlaufpuffer (Tabelle 21, Seite 33) gefüllt, die Außenseite zu einem Drittel. Die Auftrennung erfolgte zuerst während ca. 20-30 Minuten bei 80 V, bis die

Proben ins Sammelgel eingewandert waren, danach bei 130 V, bis die Laufront kurz vor dem Austreten aus dem Gel war.

3.3.10. Western Blot

Nach der Auftrennung nach Molekülmasse (Kapitel 3.3.9, Seite 52) wurden die Proteine aus dem SDS-Gel per Western Blot auf eine Membran übertragen. Hierdurch konnte später das Zielprotein angefärbt und seine Größe festgestellt werden. Die Aktivierung einer ca. 6 cm x 8,5 cm grossen Polyvinylidenfluorid-Membran erfolgte in einem 50 ml Reaktionsgefäß mit 10 ml Methanol unter beständiger Rotation während 10 min. Danach wurde die Membran dreimal mit 10 ml Wasser jeweils 5 min lang gewaschen und kurz in Transferpuffer (Tabelle 22, Seite 33) eingelegt. Das vom Sammelgel getrennte Trenngel wurde auf der Membran platziert und auf beiden Seiten wurden ein Stück Filterpapier und ein Schwamm angebracht. Die Bestandteile wurden in einer Schale mit etwas Transferpuffer zusammengesetzt und sämtliche Luftblasen zwischen den Schichten herausgepresst. Das Blotsandwich wurde so in der Westernblotkammer befestigt, dass die Membran in Richtung des Pluspols und das Gel in Richtung des Minuspols orientiert war. Durch das SDS negativ geladene Proteine wurden somit durch das später angelegte elektrische Feld in Richtung des Pluspols auf die Membran transferiert. Die Westernblotkammer wurde mit Transferpuffer gefüllt, ein Kühlpack dazugegeben und der Transfer während ca. 1 h bei 350 mA durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz mit Wasser gespült, zwischen zwei Filterpapiere gelegt und bei 50 °C während zwei Stunden im Trockenschrank getrocknet. Die Membran wurde danach entweder direkt weiterverwendet oder bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Zur Immunfärbung des Western Blots wurde die Membran in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 10 ml Methanol gegeben und für 10 Minuten im Rotator aktiviert. Danach wurde die Membran dreimal mit 10 ml Wasser jeweils 5 min lang gewaschen und dann entweder 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C im Rotator mit Milch-Blockpuffer (Tabelle 23, Seite 33) geblockt. Nach dem Blocken wurden dem Blockpuffer der Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 und 0,01 % v/v Natriumazid zur Stabilisierung zugegeben. Die Primärantikörperfärbung erfolgte während 1-2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C auf dem Rotator. Nach der Primärantikörperfärbung wurde der Primärantikörper abgenommen und konnte wiederverwendet werden. Die Membran wurde dreimal 5 min lang in TBS-T (Tabelle 20, Seite 33) gewaschen. Der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper wurde 1:5.000 im Blockpuffer verdünnt und 1-2 h bei RT im Rotator auf die Membran gegeben. Nach der Sekundärantikörperfärbung wurde die Membran zweimal 5 min lang in TBS-T und einmal in TBS

gewaschen. Zum Entwickeln wurden 0,5-1 ml HRP-Substrat (Luminata Forte oder Classico für schwach, respektive stark vorhandene Proteine) auf die Membran gegeben und 5 min lang inkubiert. Die Membran wurde danach in das Geldokumentationsgerät gelegt und mit dem Programm ImageQuant LAS 4000 entwickelt.

Sollte eine zweite Färbung erfolgen, wurden die aufgetragenen Antikörper durch Inkubation mit 0,2 M NaOH 10 min lang abgelöst. Die Membran wurde danach zweimal 5 min lang mit TBS-T gewaschen, in Folie eingeschweißt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

3.4. Histologie

3.4.1. Herstellung von Gefrierschnitten

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurde ein Kryomikrotom verwendet. Dabei befand sich ein Rotationsmikrotom in einem auf -20 °C gekühlten Kryostat. Eine entnommene Aorta (Kapitel 3.2.3, Seite 45) wurde ohne Fixierung in eine kleine, rechteckige Plastischale mit Tissue-Tek Gefriereinbettmedium gegeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Einbettmedium keine Luftblasen enthielt, da diese später das Schneiden behindert hätten. Für Längsschnitte wurde die Aorta flach in die Schale gelegt, für Gefäßquerschnitte wurde sie aufrecht gestellt. Wurde die Schale in durch Flüssigstickstoff gekühltes Isopentan platziert, gefror das Gefriereinbettmedium mit der darin enthaltenen Aorta schnell und ohne Bildung von Eiskristallen. Hierdurch wurde das Gewebe hart genug, um geschnitten werden zu können. Der erstarrte Block aus Gefriereinbettmedium wurde aus der Plastischale entnommen und mit einigen Tropfen Gefriereinbettmedium am Probenhalter befestigt. Die Temperatur des Probenhalters konnte unabhängig vom Kryostat reguliert werden und wurde der optimalen Schneidetemperatur des Gewebes, i.d.R. -18 °C, angepasst. Der Probenhalter mit daran befestigter Probe wurde so orientiert, dass die festsitzende, keilförmige Klinge in möglichst flachem Winkel auf die Probe traf. Der Gefriereinbettmediumblock wurde solange mit 50 µm Schnittdicke getrimmt, bis die gewünschte Ebene in der Probe erreicht war. Nach Einstellen der Schnittdicke auf 6-8 µm wurden Serienschnitte angefertigt und jeweils 3-4 Schnitte auf einen Objektträger für Gefrierschnitte übertragen. Die Objektträger wurden 10 min lang an der Luft getrocknet und dann entweder für Färbungen weiter verwendet oder bei -80 °C gelagert.

3.4.2. Herstellung von Paraffinschnitten

Eine entnommene Aorta (Kapitel 3.2.3, Seite 45) oder ein entnommenes Ohr (Kapitel 3.6.3, Seite 62) musste vor der Paraffineinbettung fixiert und entwässert werden. Dafür wurde das Gewebe zunächst in Formalin-Fixierlösung (Tabelle 29, Seite 34) über Nacht fixiert und danach während zwei bis drei Tage in Formalin mit 3 % Wasserstoffperoxid in einem Wärmeschrank bei 40 °C inkubiert und gebleicht. Die Bleichlösung wurde täglich erneuert. Waren die Ohren gleichmäßig weiß, wurden sie 1 h lang unter fließendem Wasser ausgewaschen. Aorten und Ohren wurden zwischen zwei Einbettschwämmchen flach in Einbettkassetten aus Plastik gelegt und entwässert. Dazu wurden die Gewebe in den Kassetten nacheinander jeweils mindestens 2 h lang in 70 % Ethanol, 85 % Ethanol, 96 % Ethanol und 99% Isopropanol eingetaucht. Aufgrund der Pigmentierung mussten Mausohren vor der Paraffineinbettung durch Inkubation in einer Mischung aus Benzylalkohol und Benzylbenzoat (1:1 v/v) während ein bis zwei Tagen transparent gemacht werden. Wurde nur ein Teilstück des Ohrs für die Anfertigung von Paraffinschnitten gebraucht, so wurde das entsprechende Stück mit einem Skalpell ausgeschnitten und weiterverwendet. Aorten und Ohren wurden vor dem Einbetten noch jeweils 1 h lang zweimal in Xylol eingetaucht. Die Gewebe wurden in den Kassetten über Nacht in einem Behälter mit flüssigem Paraffin eingelegt. Das Paraffin hatte einen Schmelzpunkt von ca. 58 °C und wurde in einem auf 60 °C eingestellten Wärmeschrank gelagert. Die mit Paraffin durchweichenden Gewebe wurden mit einer elektrisch beheizten Pinzette aus der Einbettkassette in die Gussform transferiert. Darin wurden sie für Längsschnitte flach hingelegt oder für Querschnitte aufrecht hingestellt. Ein Teil der Einbettkassette wurde als Halterung für das Mikrotom mit eingegossen. Die Gussformen wurden auf eine Kühlplatte gestellt und das Paraffin während mindestens einer halben Stunde aushärten lassen. Paraffinblöcke wurden bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert. Zum Anfertigen von Paraffinschnitten wurden sie in ein Rotationsmikrotom eingespannt und bei einer Schnittdicke von 50 µm getrimmt, bis die gewünschte Ebene in der Probe erreicht war. Die Anfertigung von Serienschnitten erfolgte bei einer Schnittdicke von 5 µm. Die Schnitte wurden in einem warmen Wasserbad 5 min lang bei 37 °C gestreckt, bevor sie auf einen Objektträger aufgezogen und 20 min lang in einen auf 60 °C eingestellten Wärmeschrank gelegt wurden. Dadurch begann das Paraffin zu schmelzen und verbesserte nach dem Abkühlen so die Haftung zwischen Probe und Objektträger. Der Objektträger wurde bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

3.4.3. CD31, CD40 und F4/80 Färbung von Gefrier- und Paraffinschnitten

Vor der Färbung von Paraffinschnitten (Kapitel 3.4.2, Seite 55) wurden diese erst entparaffiniert und rehydriert. Dazu wurden sie während je 3 min zweimal in

Xylol, sowie je einmal in 99 % Isopropanol, 96 % Ethanol, 85 % Ethanol und 70 % Ethanol getaucht. Danach wurden die Schnitte kurz mit destilliertem Wasser und anschließend mit PBS gewaschen.

Gefrierschnitte (Kapitel 3.4.1, Seite 54) wurden bei RT während 30 min aufgetaut und getrocknet, in eiskaltem Aceton 10 min lang fixiert und dann kurz mit PBS gewaschen.

Gefrier- und Paraffinschnitte wurden 30 min lang mit Blockierlösung (Tabelle 24, Seite 34) inkubiert. Um nicht den ganzen Objektträger in Blockierlösung eintauchen zu müssen, wurde mit einem PAP-Pen ein hydrophober Kreis um jede Probe gezogen. Um zu verhindern, dass die vergleichsweise kleine Menge an Blockierlösung verdunstet und die Sekundärantikörper ausbleichen, wurden die Inkubationen in einer lichtgeschützten Feuchtekammer durchgeführt. Nach dem Blockieren erfolgte die Inkubation mit Primärantikörper 1:50 – 1:100 in Blockierlösung. Verwendet wurden ein CD31 Antikörper zum Anfärben von Endothelzellen, ein F4/80 Antikörper zum Anfärben von Monozyten und Makrophagen (Austyn und Gordon, 1981) sowie ein CD40 Antikörper. Inkubation erfolgte entweder 1-2 h lang bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Nach der Primärantikörperfärbung wurden die Schnitte dreimal je 5 min lang in PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte 1:100 in Blockierlösung während 1 h bei RT. Je nach gewünschter Farbe oder bei Mehrfachfärbungen wurden dabei Cy2, Cy3 oder Cy5 konjugierte Sekundärantikörper verwendet. Nach der Sekundärantikörperfärbung wurden die Schnitte dreimal je 5 min lang mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Kernfärbung mit DAPI 1:1250 in PBS 8 min lang. Nach der Kernfärbung wurden die Schnitte zweimal je 10 min lang in PBS gewaschen und mit Mowiol und einem Deckglas eingedeckelt. Die Schnitte wurden bis zur Verwendung lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

3.4.4. HRP-Färbung von Gefrierschnitten

Zur Färbung von Gefrierschnitten (Kapitel 3.4.1, Seite 54) unter Verwendung der Meerrettichperoxidase wurde ein „DAB Enhanced Liquid Substrate System for Immunohistochemistry“ Kit verwendet. DAB diente als chromogenes Substrat für die Meerrettichperoxidase und resultierte nach Oxidation mit Wasserstoffperoxid in einer bräunlichen, alkoholunlöslichen Färbung. Das Kit enthielt eine DAB-Puffer- und DAB-Chromogenlösung, die direkt vor der Färbung gemäß Herstelleranleitung zur Entwicklungslösung vermengt wurden.

Gefrierschnitte wurden während 30 min bei RT aufgetaut und getrocknet. Zum Fixieren wurden die Schnitte 5 min lang in eiskaltes Aceton eingetaucht und

danach 30 min bei RT trocknen lassen. Die Schnitte wurden zweimal je 5 min lang in TBS-T gewaschen. Das Blockieren erfolgte während 2 h bei RT in einer Blockierlösung mit 10 % Serum (von dem Tier aus dem der verwendete Primärantikörper stammt) und 1 % BSA in TBS. Der Primärantikörper wurde 1:50-1:500 in TBS mit 1 % BSA verdünnt und auf die mit einem PAP-Pen umkreisten Proben gegeben. Die Primärantikörperfärbung erfolgte entweder während 3 h bei RT oder bei 4 °C über Nacht. Nach der Färbung wurden die Schnitte zweimal je 5 min lang in TBS-T gewaschen. Die Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität erfolgte durch 15-minütiges Eintauchen der Schnitte in 0,3 % H₂O₂ in TBS. Danach wurde einmal 5 min lang in TBS gewaschen. Der HRP-konjugierte Sekundärantikörper wurde 1:1.000 – 1:5.000 in TBS mit 1 % BSA verdünnt und während 1 h bei RT auf die Proben aufgetragen. Nach der Sekundärantikörperfärbung wurde dreimal je 5 min lang mit TBS gewaschen und die DAB-Lösung zum Entwickeln maximal 10 min lang bei RT auf die Proben gegeben. Nach der Entwicklung wurden die Schnitte während 5 min unter laufendem Wasser gewaschen. Optional folgte noch eine Zellkernfärbung mit Hämatoxylin. Dazu wurden die Schnitte 8 min lang in Hämatoxylin eingetaucht, kurz mit demineralisiertem Wasser abgewaschen und dann während 10 min mit Leitungswasser gebläut. Nach der HRP-Färbung und der gegebenenfalls erfolgten Zellkernfärbung wurden die Schnitte entwässert. Dazu wurden sie in der aufsteigenden Alkoholreihe jeweils 3 min lang einmal in 70 % Ethanol, 85 % Ethanol, 96 % Ethanol, 99% Isopropanol und zweimal in Xylol getaucht. Die entwässerten Schnitte wurden dann mit Eukitt eingedeckt und bis zur Verwendung lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

3.4.5. Oil Red O-Färbung

Der rote, fettlösliche Azofarbstoff Oil Red O wurde verwendet um Lipide anzufärben. Da die atherosklerotische Plaquebildung mit Einlagerungen von Lipiden in die Blutgefäßwand beginnt, konnten damit auch frühe Plaques detektiert werden. Einer freipräparierten Aorta (Kapitel 3.2.3, Seite 45) wurden die Karotiden abgetrennt und die Aorta wurde der Länge nach aufgeschnitten. Dies erfolgte in einer mit PBS gefüllten Petrischale mit Silikonunterlage, um das Austrocknen des Gewebes zu verhindern. Die zwei Hälften wurden auseinandergeklappt und mit feinen, 30 G Kanülen auf der Silikonunterlage aufgespannt. Die Karotiden wurden ebenfalls aufgespannt. Das PBS wurde entfernt, die Schale mit Formalin-Fixierlösung (Tabelle 29, Seite 34) gefüllt und die Aortenstücke während 30 min bei RT fixiert. Danach wurde das Formalin abgesaugt und die Aortenstücke wurden dreimal je 5 min lang mit PBS gewaschen. Die Gefäßstücke wurden in ein 1 ml Mikroreaktionsgefäß mit 78 % Methanol in PBS gegeben und 10 min lang inkubiert. Die Aortenstücke wurden in ein 1 ml Mikroreaktionsgefäß mit 1 ml ORO-Arbeitslösung (Tabelle 26, Seite 34)

transferiert und 10 min lang gefärbt. Nach der Färbung wurden die Aortenstücke während maximal 5 min in 78 % Methanol plus PBS entfärbt, um überschüssige ORO-Färbung abzuwaschen. Auf einen Objektträger wurden 60 µl Mowiol gegeben und die Aortenstücke darin entsprechend ihrer Position in der Maus angeordnet. Ein Deckglas wurde aufgesetzt, angepresst und der Objektträger bis zur Auswertung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

3.5. Visualisierung von atherosklerotischen Plaques

3.5.1. 2D Ultraschallmessung von Mäusen zur Plaque-Lokalisierung

Zur Ultraschalluntersuchung von Mäusen wurde die Maus in eine durchsichtige und luftdichte Box gesetzt und ein Sauerstoff-Isofluran Gemisch zur Narkotisierung eingeleitet. Flüssiges Isofluran wurde mittels eines Verdampfers gasförmig gemacht und mit 0,5 l/min Sauerstoff aus einem Sauerstoff-anreicherungsgerät angereichert. Die Narkose wurde mit 4 % des Isofluran Gemisches gestartet und mit 2 % fortgeführt. Die Maus wurde in Rückenlage auf einer in alle Richtungen schwenkbaren Heizplattform mit Elektrodenfeldern platziert, Schnauze und Nasenpartie in einem Röhrchen mit Gummiabdeckung, so dass das dort einströmende Narkosegas nicht in den Raum entweichen konnte. Überschüssiges Narkosegas wurde abgesaugt und durch einen Kohlefilter geleitet. Die Extremitäten der Maus wurden mit schwach haftendem Klebeband und unter Verwendung von Kontaktgel auf den Elektrodenfeldern zur Atem- und Pulsmessung fixiert. Eine rektale Temperatursonde wurde mit etwas Gleitgel eingeführt, um die Temperatur der Maus zu überwachen. Bei Bedarf wurde eine Wärmelampe auf die Maus gerichtet, um ihre Körpertemperatur konstant zu halten.

Das Bauchfell wurde zwischen Kehlkopf und Brustkorb zuerst mit einem Rasierapparat entfernt, die Reste dann mit Enthaarungscreme. Der Bauch wurde mit in einem Flaschenwärmer vorgewärmtem Wasser von Fell- und Cremeresten befreit. Vorgewärmtes Ultraschallgel wurde luftbläschenfrei auf den Bauch der Maus aufgetragen. Der MS550 beziehungsweise MS700 Schallkopf wurde an das Vevo 2100 System von Visualsonics angeschlossen und mit dem höhen-verstellbaren Schienensystem in Position gebracht, um die Maus untersuchen zu können. Dazu wurde die Plattform leicht nach vorne und zur Seite gekippt, so dass der Schallkopf leichter in einem Winkel von 15 ° zur Maus positioniert werden konnte. Der Schallkopf wurde parallel zur Ausrichtung der Maus auf dem Brustkorb angesetzt. Dabei berührte er die Maus nicht direkt, um eine Deformation des Brustkorbs zu vermeiden, war jedoch durch das Ultraschallgel lückenlos in Kontakt mit der Maus. Zur Orientierung wurde der Schallkopf beim oberen Ende des Brustbeins angesetzt, so dass man sich leicht an den Rippenschatten orientieren und das Herz und die Aorta lokalisieren konnte.

Nach der Darstellung der Aorta war an deren Verlauf, der Aortenbogen sowie die Abgänge *Truncus brachiocephalicus*, *Arteria carotis communis sinistra* und *Arteria subclavia sinistra* erkennbar. In der Software des Vevo 2100 Systems war es nun möglich Aufnahmen zu machen, die z.B. die Gefäßbewegung während eines einzelnen Herzschlages zeigen oder den Blutfluss im Gefäß darstellen. Auf den Aufnahmen konnten bei älteren ApoE-KO Mäusen die atherosklerotischen Plaques identifiziert und quantifiziert werden. Da es sich dabei jedoch um 2D Aufnahmen handelte, konnten eher Aussagen über Vorhandensein und Lokalität der Plaques als ihre Ausdehnung getroffen werden. Für eine Volumenmessung der Plaques mussten 3D Aufnahmen angefertigt werden. Nach der Ultraschalluntersuchung wurde die Isofluran- und Sauerstoffzufuhr gestoppt und die Maus zum Aufwachen zurück in den Käfig gelegt. Das Wohlbefinden der Maus wurde während dem Aufwachen und regelmäßig in den darauffolgenden Tagen kontrolliert.

3.5.2. 3D Ultraschallmessung von Mäusen zur Plaque-Volumenbestimmung

Um das Volumen von Plaques bestimmen zu können, musste ein zusätzlicher 3D-Motor, der den Schallkopf automatisch bewegen konnte, am Schienensystem montiert werden. Die Maus wurde narkotisiert und vorbereitet (Kapitel 3.5.1, Seite 58), aber der Schallkopf wurde nicht parallel, sondern orthogonal zur Maus ausgerichtet, um den Gefäßquerschnitt sichtbar zu machen. Die Länge des Bereiches, von dem die 3D Aufnahme gemacht werden sollte, wurde ausgemessen und der Schallkopf in der Mitte davon platziert. In der Software wurden die Länge des Messbereiches eingegeben und wie viele Bilder in diesem Abschnitt gemacht werden sollen. Auch die Bildbreite konnte ausgewählt werden. Für die 3D Aufnahmen war es unabdingbar, dass die Atmung und Herzfrequenz korrekt gemessen wurde. Die Aufnahmen erfolgten im Rhythmus der Herzkontraktionen, um ein scharfes Bild zu gewährleisten. Die Vevo 2100 Software hat eine Funktion, um selbständig die optimalen Aufnahmezeiten im kardialen Zyklus zu detektieren, wenn die Vorder- und Hinterpfoten der Maus in Kontakt mit den Elektrodenfeldern auf der Heizplattform waren.

Die angefertigten 3D Aufnahmen, eine Aneinanderreihung von Querschnitten in kleiner räumlicher Abfolge, konnten in der Software analysiert werden. Dazu wurde in jedem aufeinanderfolgenden Bildabschnitt der Plaqueumfang eingezeichnet und mithilfe der Software das Plaquevolumen berechnet. Wurde auch das Arterienvolumen eingezeichnet, konnte das Plaquevolumen in Relation zum Arterienvolumen angegeben werden. Die 3D Ansicht erlaubte auch eine bildliche Darstellung der Arterie und darin enthaltenen Plaques.

3.5.3. Auswertung Plaque-Größe bei Oil Red O-Färbungen

ORO gefärbte Aorten und Karotiden (Kapitel 3.4.5, Seite 57) wurden mithilfe eines Scanners digitalisiert (Dia-Modus, Gamma = 2,2). Die beim Scannen gewählte Bildgröße wurde in die Bildbearbeitungssoftware ImageJ übertragen (Analyze > Set Scale > bekannte Länge des Bildes in mm der Pixellänge des Bildes gleichgesetzt), so dass die genauen Dimensionen für die spätere Flächenberechnung bekannt waren. Die farbigen Aufnahmen wurden in Graustufen umgewandelt (Image > Type > 8-bit). Da das Gefäß blass und die rote ORO-Färbung deutlich zu sehen war, war es nicht nötig eine FarbkompONENTEN-auftrennung durchzuführen. Mit der Schwellen-Funktion (Image > Adjust > Threshold) wurden die Aufnahmen analysiert. Der obere und untere Schwellenwert wurde so gewählt, dass nur die Plaque-Bereiche markiert waren. Nachdem der Messbereich auf den Schwellenwertauswahlbereich limitiert wurde (Analyze > Set Measurements > Area, Limit to threshold), erfolgte die Vermessung der markierten Plaque-Bereiche (Analyze > Measure). Als Resultat erhielt man die Fläche des Schwellenwertauswahlbereiches, der der ORO-Färbung und somit der Fläche von atherosklerotischen Plaques entsprach. Wurde der Schwellenwert so gewählt, dass das gesamte Gefäß, ungeachtet der ORO-Färbung, ausgewählt war, konnte man die Fläche des Gefäßes ermitteln. Somit konnte die Plaque-Fläche sowohl in absoluter Größe, als auch prozentual zum Gefäß angegeben werden.

3.6. Arteriogenese

3.6.1. Ligatur der Arterien im Mausohr

Eine Maus wurde mit Isofluran narkotisiert (Kapitel 3.5.1, Seite 58) und bei konstanter Isofluranzufuhr auf einer beheizten Plattform mit höhenverstell- und beleuchtbaren Ohrstützen platziert (Abbildung 8, Seite 61). Da es sich bei den verwendeten Mäusen um C57BL/6NCrl Mäuse mit schwarzer Fellfarbe handelte, mussten die Ohren zur Vermeidung von späterer Sichtbehinderung enthaart werden. Dazu wurde das Ohr mit Enthaarungscreme bestrichen, diese für ein paar Minuten einwirken gelassen, und mit vorgewärmtem, sterilem Wasser sorgfältig abgewaschen. Mit einer ans Mikroskop angeschlossenen Kamera wurden Aufnahmen der enthaarten Ohren gemacht. Anhand dieser Übersichtsaufnahme wurde eine der Verästelungen der *Arteria auricularis caudalis* zur Ligatur ausgewählt und das Ohr mit einem Antiseptikum (Octonisept) desinfiziert. Mit einer chirurgischen Nadel wurde zu beiden Seiten der Arterie die Ohrmuschel durchstoßen und mit 6-0 Ethylen Nahtmaterial ein doppelter chirurgischer Knoten um die Arterie gelegt und festgezogen. Der Faden wurde möglichst nahe am Knoten abgetrennt. Dies war notwendig, um zu verhindern, dass die Maus ihn zu fassen bekam und den Knoten lösen konnte. Mit dem

Mikroskop und der Kamera wurde eine Post-Ligatur Aufnahme gemacht. Anschließend erfolgte die Behandlung der Ligatur und des umliegenden Bereichs mit Jodlösung. Die Isofluran- und Sauerstoffzufuhr wurde gestoppt und die Maus in den Käfig zurückgelegt. Das Aufwachen der Maus wurde beobachtet und ihr Wohlbefinden in den Tagen danach regelmäßig kontrolliert. Weitere Übersichtsaufnahmen wurden nach vier und sieben Tagen gemacht, um den Verlauf der durch die Ligatur bedingten Arteriogenese zu dokumentieren.

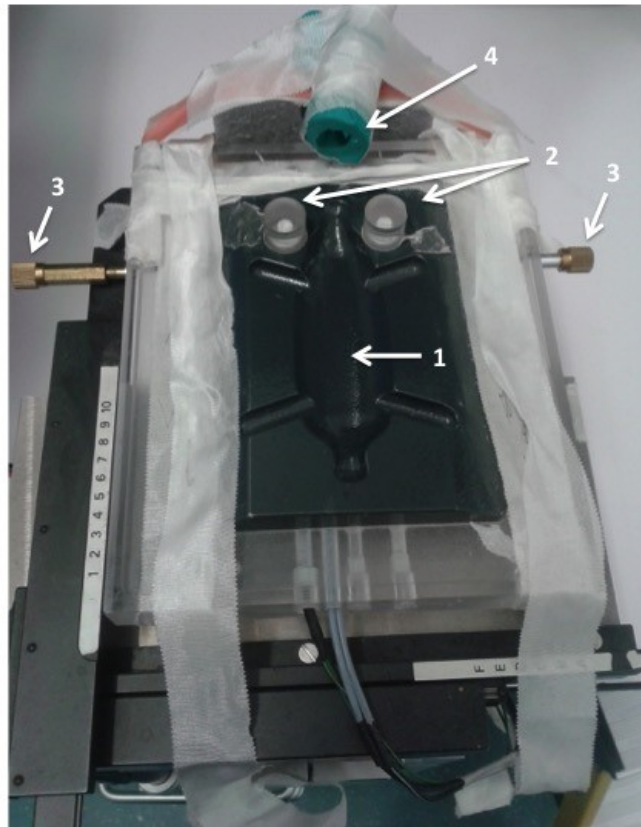


Abbildung 8: Plattform für die Ligatur von Mausohrarterien

Die Plattform besteht aus einer beheizbaren Form (1), worin die Maus platziert werden kann. Die durch integrierte Lämpchen beleuchteten Ohrenstützen (2) sind individuell höhenverstellbar (3). Nase und Maul der Maus werden in einer abgedichteten Röhre (4) platziert, in der sich Zu- und Abluft des Narkosegases befinden.

3.6.2. Blutflussdarstellung im Mausohr mit dem PSI System

Bei einer narkotisierten und an den Ohren enthaarten Maus (Kapitel 3.6.1, Seite 60) wurde vor und nach der Arterien-Ligatur mithilfe des PeriCam PSI High Resolution System der Blutfluss gemessen. Es ist ein Gerät zur Laser Speckle Kontrast Bildgebung (LSCI). Das PeriCam Gerät erzeugt mit einem 785 nm Laser und einem Diffusor ein für das Auge unsichtbares, Fleckenmuster auf der Messfläche. Veränderungen des Fleckenmusters aufgrund des Blutflusses wurden von der CCD-Detektorkamera registriert. Ein für das Auge sichtbarer 650 nm Laser erzeugte eine optische Begrenzung der Messfläche und

erleichterte somit die Ausrichtung. Mithilfe der automatischen Distanzmessung wurde eine optimale Messdistanz von 10 cm eingestellt. Mit einer zusätzlichen Farbkamera nahm das Gerät regelmäßig Übersichtsaufnahmen auf, die zur Orientierung beitrugen und sicherstellten, dass das aufgenommene Objekt nicht verschoben wurde. Mit der Gerätesoftware PIMSoft wurde der Blutfluss angezeigt und ausgewertet. Durch Verkleinerung der Messfläche konnte die Rechenleistung gesteigert und so eine höhere Auflösung und Aufnahme Frequenz (maximal 44 Bilder/Sekunde) erzielt werden. Für die Auswertung erfolgte die Glättung der Daten durch eine Zusammenfassung von 10 aufeinanderfolgenden Bildern. Die Aufnahmen konnten als Bild- oder Filmdateien exportiert werden.

Die PeriCam wurde auf ein mit etwas Kontaktgel auf der Ohrstütze festgeklebtes Ohr der narkotisierten Maus gerichtet. Dabei wurde die ideale Messdistanz von 10 cm eingestellt und der Messbereich auf das Ohr reduziert. Die Aufnahme wurde gestartet und während einigen Minuten laufen lassen, um sicherzustellen, dass das System im Gleichgewicht war. Besonders geachtet wurde darauf, dass die Körpertemperatur der Maus konstant bei ca. 38 °C lag. Dies war wichtig, da die Durchblutung stark von der Körpertemperatur abhängig ist. Die Überprüfung der Körpertemperatur der Maus erfolgte mit einer Infrarot Thermometer-Pistole. War sichergestellt, dass die Temperatur und somit der Blutfluss konstant war, wurde während einer Minute der Blutfluss aufgezeichnet. Die Aufnahmen wurden auf die gleiche Art und Weise vor und nach der Ligatur der Ohrarterie gemacht. Die Aufnahmen nach der Ligatur sollten bestätigen, dass die Blutversorgung distal der Ligatur unterbrochen war. Vier und sieben Tage nach der Ligatur wurde erneut der Blutfluss gemessen. Dabei wurde überprüft, ob durch Arteriogenese die Perfusion im Bereich distal der Ligatur wieder zunahm. Die Auswirkung einer durch Ligatur ausgelösten Umgestaltung der Arterien sollten aufgezeigt werden. Es wurde jedoch festgestellt, dass vor allem der Blutfluss der Venen dargestellt wurde. Da Arterien und Venen im Mausohr sehr nahe beieinander verlaufen und die Venen einen größeren Lumendurchmesser haben, zeichnete die PeriCam vor allem die Venen auf oder konnte zumindest nicht zwischen Arterien und Venen unterscheiden. Aus diesem Grund wurde die Partikel-Perfusion zur Darstellung der Arteriogenese verwendet.

3.6.3. Farbpartikelperfusion zur Darstellung der Arteriogenese

Sieben Tage nach der Ligatur einer Ohrarterie (Kapitel 3.6.1, Seite 60) wurde eine Farbpartikellösung durch die Arterien gepumpt, um alle Arterien, aber vor allem die durch Arteriogenese veränderten Arteriolen, sichtbar zu machen. Die Farbpartikellösung bestand aus Partikeln roter Malfarbe, die zu groß waren, um durch die Kapillaren nach den Arteriolen durchzutreten. Somit sammelten sie sich nur im arteriellen System an und färbten dieses dadurch an. Von der

Malfarbe wurden 8 g in 50 ml Zink-Fixierlösung (Tabelle 27, Seite 34) mithilfe eines Ultraschall-Homogenisators gelöst. Die Farblösung wurde 1 min lang bei 300 g zentrifugiert, um ungelöste Klumpen zu entfernen. Der Überstand wurde entnommen und für die Partikelperfusion verwendet. Vor der Partikelperfusion erfolgte eine normale Perfusion zur Entfernung des Blutes (Kapitel 3.2.2, Seite 45). Es wurde darauf geachtet, dass gegebenenfalls austretende Farblösung nicht mit der Außenseite der Ohren der Maus in Kontakt kam und diese unspezifisch anfärbte. Dazu wurde ein Keil aus Schaumstoff unter den Kopf der Maus geschoben, um diesen mitsamt den Ohren vom Boden und gegebenenfalls austretender Farblösung fernzuhalten. Es wurden ca. 30 ml Farbpartikellösung in das arterielle Blutsystem gepumpt, bis die Färbung der Ohrarterien mit bloßem Auge sichtbar war. Die Ohren wurden mit einer Schere abgetrennt und bis zur Weiterverarbeitung in PBS gelagert.

3.7. ibidi Slides

3.7.1. ibidi Slide HUVEC Aussaat

Um die Sterilität der Slides auch außerhalb der Sterilbank zu gewährleisten, wurden die μ -Slides (ibidi, München) μ -Slide I Luer, μ -Slide Membrane ibiPore Flow (Transmigrationslide; Abbildung 9, Seite 64) und μ -Slide y-shaped unter der Sterilbank in eine leere, sterile Zellkulturschale transferiert. Die μ -Slides wurden vor dem Beschichten zusammen mit dem Kollagen (Tabelle 7, Seite 30) mindestens 1 h lang bei 37 °C vorgewärmt, um eine Luftblasenbildung zu vermeiden. 200 μ l Kollagen wurden in ein Reservoir gegeben und direkt durch das andere Reservoir abgesaugt. Somit war der Kanal gefüllt, die Reservoire dementsprechend leer. Nach mindestens 1 h Beschichtung bei 37 °C wurden die μ -Slides mit vorgewärmtem PBS wie beim Beschichten gewaschen und wieder mindestens 1 h lang bei 37 °C gelagert. Bei Transmigrationslides wurde vor dem Hauptkanal der kleinere Kanal auf dieselbe Art und Weise beschichtet, gewaschen und danach verschlossen.

Eine 60 mm Petrischale mit HUVECs (70-90 % Konfluenz) wurde mit PBS zweimal gewaschen und die Zellen wurden mit Trypsin während 3-5 Minuten im Inkubator bei 37 °C abgelöst. Diese wurden in vorgewärmtem Endothelzellmedium aufgenommen und 5 min lang bei 170 g zentrifugiert. Eine vor dem Zentrifugieren entnommene Probe wurde zur Zellzählung verwendet. Danach wurde das Zellpellet in Endothelzellmedium aufgenommen und auf eine finale Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Slides wurden mit 200 μ l dieser Zellsuspension von der einen Seite her befüllt, überstehende Zellsuspension wurde auf der anderen Seite abgesaugt, bis die Reservoire leer waren. Die Slides wurden 1 h lang im Inkubator bei 37 °C inkubiert, um so das Anhaften der Zellen zu ermöglichen.

Bei den Transmigrationslides wurde das Slide invertiert, so dass die Zellen an der porösen Membran an der Decke des Kanals anhaften konnten. Nach Ablauf der einstündigen Anhaftungszeit wurden die Reservoirs mit vorgewärmtem Endothelzellmedium zur Hälfte gefüllt. Danach wurden die Slides mit den Zellen auf einen Kipptisch in einen Inkubator gestellt und 2-3 Tage unter kontinuierlichem Schwenken (600/Stunde) bis zur 100%igen Konfluenz kultiviert. Ungefähr alle 12 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel.

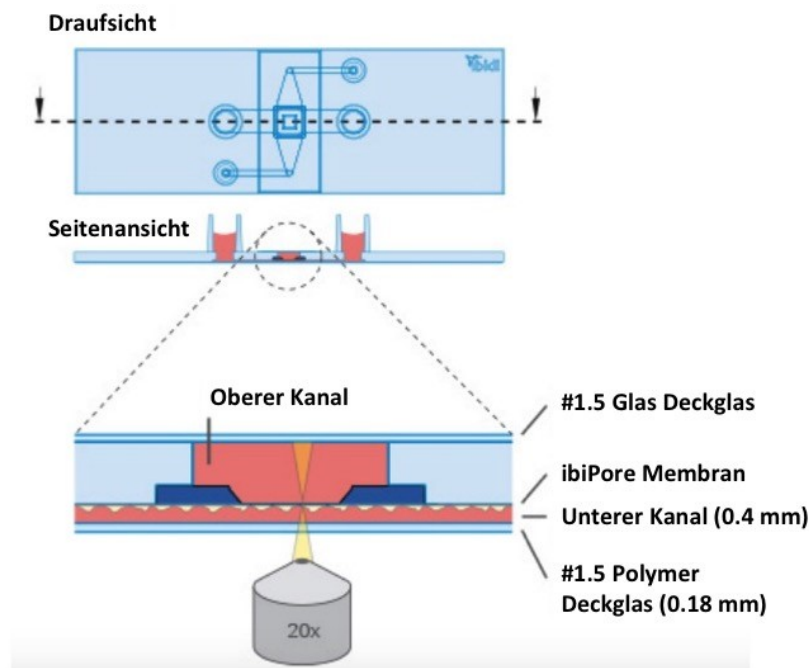


Abbildung 9: Querschnitt durch ein Transmigrationslide

Das μ -Slide Membrane ibiPore Flow besitzt einen unteren und oberen Kanal, die durch eine poröse Glasmembran verbunden sind. Endothelzellen werden an der Decke des unteren Kanals angesiedelt. In den oberen Kanal gegebene Chemokine, wie z.B. MCP-1, veranlassen Monozyten zur Transmigration durch die Endothelzellschicht vom unteren in den oberen Kanal (Abbildung modifiziert nach (ibidi, 2015b))

3.7.2. Isolation und Färbung humaner Mono-, Thrombo- und Erythrozyten

Mit Genehmigung der lokalen Ethikkommission (Antrag S-181/2013) wurden nach schriftlicher Einwilligung gesunden Spendern aus der mittleren Vene der Ellenbeuge nach Desinfektion der Haut jeweils 8-10 EDTA-Röhrchen Vollblut für die Monozyten- und 3 Citrat-Röhrchen Vollblut für die Thrombozyten- und Erythrozytenisolation abgenommen.

Zur Thrombozytenisolation erfolgte die Zentrifugation der Citrat-Röhrchen umgehend bei 180 g 12 min lang ohne Bremse. Zur Vermeidung einer Verunreinigung mit Erythrozyten wurden nur zwei Drittel (ca. 5-6 ml) des PRP abgenommen, 1 μ M PGE1 und 0,02 U/ml Apyrase zugegeben und 12 min lang bei

900 g ohne Bremse zentrifugiert. Das Thrombozytenpellet wurde in 1 ml HEPES-Tyrode (Tabelle 30, Seite 35) mit 1 μ M PGE1 und 0,02 U/ml Apyrase und 2 μ l Calcein Green aufgenommen. Die Thrombozyten wurden während 1 h bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Danach wurden die Thrombozyten bei 180 g 12 min lang ohne Bremse zentrifugiert und das Pellet in 10 ml HEPES-Tyrode mit 1 μ M PGE1 und 0,02 U/ml Apyrase aufgenommen. Nach zweimaligem Zentrifugieren und Waschen wurde das Thrombozytenpellet in HEPES-Tyrode mit 0,02 U/ml Apyrase zu einer Konzentration von 20×10^6 Zellen/ml gelöst und im Inkubator auf einem Kipptisch bei 37 °C bis zur Verwendung gelagert.

Zur Erythrozytenisolation wurde aus den Citrat-Röhrchen das letzte Drittel PRP entfernt. Die darunter befindlichen Erythrozyten wurden mit PBS auf 50 ml aufgefüllt, dreimal mit PBS gewaschen und bei 180 g 12 min lang ohne Bremse zentrifugiert. Zum Schluss wurden die Erythrozyten in HEPES-Tyrode gelöst und ein Hämatokritwert von ca. 45 % eingestellt. Die Erythrozyten wurden im Inkubator auf einem Kipptisch bei 37 °C bis zur Verwendung gelagert.

Zur Isolation von Monozyten wurde das Blut aus den EDTA-Röhrchen mit PBS 1:1 (v/v) verdünnt und in mit 15 ml Pancoll befüllte Leucosep-Röhrchen mit Trennscheibe gegeben. Nach 15 min Zentrifugation bei 800 g ohne Bremse reicherten sich Leukozyten an der Trennschicht zwischen Pancoll und Blutplasma an. Das Plasma wurde bis kurz über die Trennschicht abgesaugt. Die Leukozyten wurden sorgfältig abgenommen, danach mit 2 mM EDTA in PBS gewaschen und bei 350 g 5 min lang zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis der Überstand nach der Zentrifugation klar war. Die Anzahl Leukozyten wurde bestimmt und die dementsprechende Menge an Reagenzien zur Monozytenaufreinigung aus dem Monozytenisolutionskit (Miltenyi Biotec) vorbereitet. Die Isolation der Monozyten aus dem Leukozytengemisch erfolgte mithilfe von magnetischen Kügelchen und MACS gemäß Herstellerprotokoll. Die Monozytenkonzentration wurde bestimmt, die Monozyten wurden in 1 ml MACS Puffer (Tabelle 31, Seite 35) mit 5 μ l CellTracker Red zur Fluoreszenz-Markierung aufgenommen. Die Monozyten wurden 1 h bei 37 °C lichtgeschützt inkubiert, danach dreimal mit MACS Puffer gewaschen und nochmals bei 350 g 5 min lang zentrifugiert. Zum Schluss wurde mit MACS Puffer eine Konzentration von ca. 6×10^6 Zellen/ml eingestellt und die Monozyten wurden im Inkubator auf einem Kipptisch bei 37 °C bis zur Verwendung inkubiert.

3.7.3. ibidi Slide Perfusion

Slides, in denen die HUVECs nach der Aussaat (Kapitel 3.7.1, Seite 63) Konfluenz erreichten, wurden in das ibidi Perfusionssystem eingesetzt. Das Perfusions-

system besteht aus einer ibidi Pumpe, die zusammen mit der Flusseinheit und der Pumpenkontrollsoftware eine kontinuierliche, unidirektionale Perfusion des Slides ermöglichte (siehe Abbildung 10, Seite 66). Die Flusseinheit war in einem Brutschrank untergebracht, um eine konstante Temperatur der Perfusionslösung von 37 °C zu gewährleisten. Das Slide wurde in einem ibidi Heizsystem, bestehend aus einer beheizten Platte mit beheiztem Deckel und einem Temperaturkontrollgerät, untergebracht. Das Slide wurde mitsamt Heizsystem auf einem invertierten Mikroskop mit einer 120 W Halogen-Metall dampflampe und einem Grün (Anregung 470-490 nm, Emission 500-550 nm) und Rot (Anregung 455-570 nm, Emission 610-665 nm) Filterset platziert. Dieser Versuchsaufbau erlaubte die kontinuierliche Perfusion des Slides bei einer konstanten Temperatur und ermöglichte die Beobachtung und Aufzeichnung des Experimentes via Mikroskop und einer integrierten Kamera in Echtzeit.

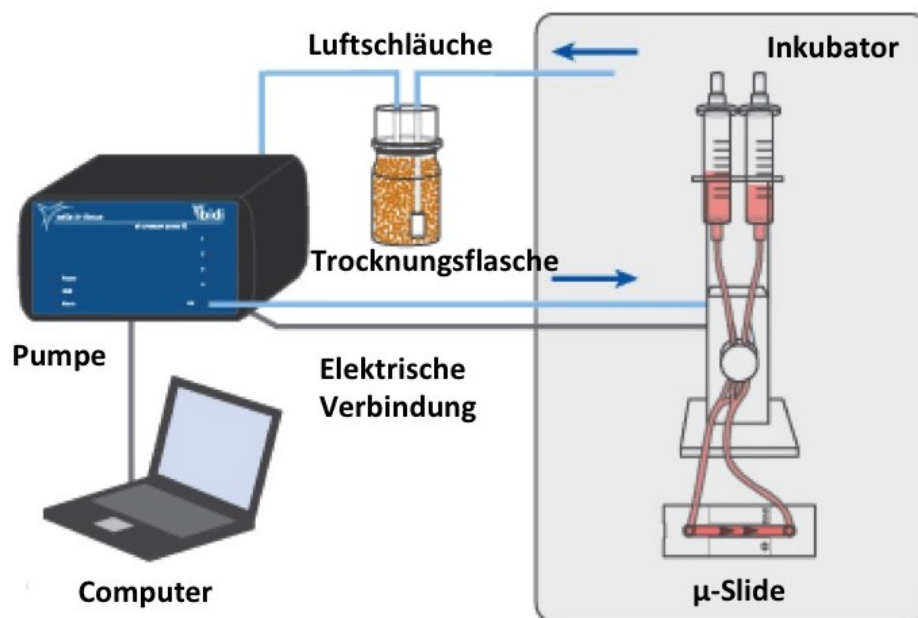


Abbildung 10: ibidi Pumpensystem

Das ibidi Pumpensystem besteht aus einer Luftdruckpumpe, elektronischen Steuerung und einer Flusseinheit. Der von der Pumpe erzeugte Druck presst das Medium von einem Reservoir der Flusseinheit durch das Slide in das andere Reservoir. Durch Schaltung der Flusseinheitsventile wird das Medium wieder zurück ins ursprüngliche Reservoir geleitet, die Strömungsrichtung im Slide wird dabei jedoch nicht umgekehrt. Abbildung modifiziert nach (ibidi, 2015a).

Als Perfusionslösung wurde ein Erythrozyten-HEPES-Tyrode Gemisch mit einem Hämatokritwert von 45 % verwendet. Die Slides wurden dann während einigen Minuten mit einem Fluss, der einer Scherkraft von 10 dyn/cm² entsprach, perfundiert. Der dazu benötigte Fluss wurde von der Software anhand der Slide Ausmessungen errechnet. Der Perfusionslösung wurden das Stimulans sCD40L zu einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml, die Calcein Green gefärbten Thrombozyten zu einer Endkonzentration von 20x10⁶ Zellen/ml und zum

Schluss die Monozyten zu einer Endkonzentration von 6×10^6 Zellen/ml zugegeben. Dem Perfusionssystem wurden einige Minuten Zeit gegeben, um die gleichmäßige Verteilung der Komponenten in der Perfusionslösung und dem Slide zu gewährleisten. Für die Analyse der initialen vWF-Freisetzung und Bildung von ULVWF-Multimeren wurden die ersten drei Minuten der Perfusion stationär aufgezeichnet. Für die Analyse der Monozytenbindung wurden nach einigen Minuten mit dem 20-fach Objektiv in Flussrichtung von einem bis zum anderen Ende des Slides Videoaufnahmen gemacht.

3.7.4. ibidi Slide Fluoreszenzfärbung nach Perfusion

Nach der Perfusion des Slides mit Blut, Thrombozyten und Monozyten (Kapitel 3.7.3, Seite 65) wurde es aus dem System entnommen, das darin enthaltene Blut mit HEPES-Tyrode ausgespült und die Zellen wurden mit Zink-Fixierlösung 1 h lang bei RT fixiert. Anschließend wurde die Fixierlösung erst mit Wasser und dann mit PBS ausgespült und Blockierlösung (Tabelle 24, Seite 34) während 1 h zugegeben. Danach erfolgte die Inkubation mit primärem anti-CD31- und primärem anti-vWF-Antikörper 1:100 in Blockierlösung. Nach 1 h Primärantikörperinkubation bei RT wurde das Slide mit PBS ausgewaschen und entsprechend zum Primärantikörper Dailight405, Cy2, Cy3 oder Cy5 gekoppelter Sekundärantikörper in Blockierlösung zugegeben. Nach 2 h Sekundärantikörperinkubation bei RT im Dunkeln wurde das Slide mit PBS ausgewaschen und mit einem Konfokalmikroskop analysiert.

3.7.5. Auswertung ibidi Slide Perfusion

Für die Kontrastverstärkung von Aufnahmen der Slide Perfusion (Kapitel 3.7.3, Seite 65) wurden die Bilder mit der verwendeten Kamerasoftware nachbearbeitet. Die in den Farbkanälen Grün (Thrombozyten) und Rot (Monozyten) gemachten Aufnahmen wurden in der Bildbearbeitungssoftware ImageJ zusammengefügt. Die Aufnahmen wurden in ImageJ Bild für Bild analysiert und alle ULVWF-Multimere, ihre Länge und Position im Slide sowie alle Monozyten und ihre Anhaftungspositionen aufgezeichnet. Die statistische Auswertung und grafische Darstellung dieser Daten erfolgte in Excel.

3.8. Gefäßperfusionsmodell

3.8.1. Perfusionsplattform

Für die Gefäßperfusion wurde entweder ein unverzweigter Abschnitt der *Arteria carotis communis* oder die Karotisverzweigung präpariert (Kapitel 3.2.3, Seite

45). Das Gefäß wurde im mit DMEM gefüllten Organbad (1) der Perfusionsplattform (siehe Abbildung 11, Seite 69.) auf die zuvor mit einem Mikropipetten-Puller gezogenen eine afferente (2) und zwei efferenten (3) Glaskapillaren aufgezogen. Dabei wurde das Gefäß an seinen Enden mit zwei Mikropinzetten sorgfältig, möglichst nur an der Adventitia, gehalten um Verletzungen des Gefäßes und Endothels zu vermeiden. Die Öffnungen der Kapillaren wurden durch Abbrechen individuell an das Gefäßlumen angepasst, so dass das Gefäß beim Aufziehen nicht locker saß, aber auch nicht überdehnt werden musste.

Jedes Gefäßende wurde mit zwei Knoten (5) aus 11-0 Nahtmaterial an den Kapillaren befestigt. Die Knoten waren dabei im Voraus geknüpft und auf die Kapillaren aufgezogen, aber noch nicht festgezogen, worden. Die Kapillaren waren an Mikromanipulatoren (4) befestigt, die eine Feinjustierung der Kapillaren erlaubten. Dadurch wurden erst die Kapillaren auf dieselbe Höhe ausgerichtet und nach dem Aufziehen des Gefäßes wurde dieses entsprechend seiner Situation *in vivo* aufgespannt. Das Aufspannen des Gefäßes war nötig um der Gefäßverkürzung entgegenzuwirken. Die Verkrüzung erfolgte jeweils bei der Entnahme des Gefäßes aus der Maus aufgrund sich zusammenziehender Elastinfasern bei fehlender Gefäßspannung.

Zu- und Abfluss wurden mit Dreiweghähnen geregelt. Aus einem in ca. 30 cm Höhe angebrachten Reservoir wurde DMEM von der Schwerkraft durch einen am afferenten Dreiweghahn angeschlossenen Schlauch ins Gefäß geleitet. Es wurde besonders darauf geachtet, dass keine Luftblasen im Schlauchsystem vorhanden waren, da diese sonst die Endothelzellschicht beschädigten. Durch Öffnen des afferenten Dreiweghahns (6) bei geschlossenen efferenten Dreiweghähnen (7) wurde Druck im Gefäß aufgebaut, so dass sich das Gefäß sichtbar dehnte. Wurde der afferente Dreiweghahn geschlossen, konnte anhand des Gefäßdurchmessers die Dichtigkeit des Systems geprüft werden. Verlor das Gefäß sofort seinen Innendruck und zog sich zusammen, hatte es entweder ein Loch, einer der ligierten Abgänge (8) war nicht dicht abgebunden oder eins der Gefäßenden saß nur locker auf der Kapillare. Blieb der Gefäßdurchmesser annähernd konstant, wurde das System als dicht betrachtet und für den Versuch verwendet.

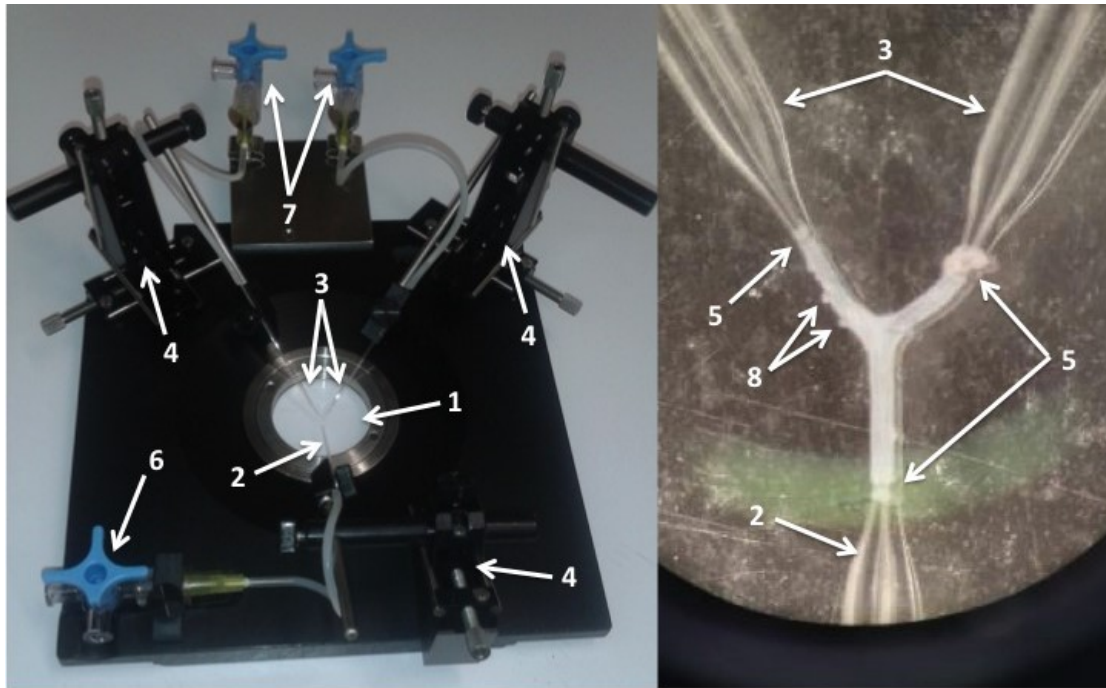


Abbildung 11: Perfusionsplattform

Die Perfusionsplattform (links) und der Blick auf ein darin aufgespanntes Gefäß durch das Okular eines Mikroskops (rechts). In der Mitte der Plattform befindet sich das, während einem Versuch mit DMEM gefüllte, Organbad (1). Das Organbad besitzt einen durchsichtigen Boden, welcher die Benutzung eines invertierten Mikroskops ermöglicht. Auf einer afferenten (2) und zwei efferenten (3) Glaskapillaren wird das Gefäß aufgezoogen. Die Mikromanipulatoren (4) erlauben das Feinjustieren und Aufspannen des Gefäßes, welches an jedem Ende mit jeweils zwei Knoten (5) an den Kapillaren befestigt ist. Über den afferenten (6) und die efferenten (7) Dreiweghähne wird der Zu- und Abfluss geregelt. Auf dem rechten Bild sind am Gefäß die ligierten Abgänge (8) zu sehen.

3.8.2. Gefäßperfusion und Fixierung

Nach dem Aufziehen des Gefäßes auf die Perfusionsplattform (Kapitel 3.8.1, Seite 67) wurde die Plattform in einen Inkubator mit 37 °C und 5 % CO₂ gestellt. Die Plattform wurde über ein Schlauchsystem an eine außerhalb des Inkubators befindliche Luftdruckpumpe angeschlossen. Die regulierbare Pumpe wurde auf ca. 20 mmHg eingestellt und beförderte vorgewärmtes Medium von einer Flasche im Inkubator durch den afferenten Dreiweghahn durch das Gefäß. Erneut wurde besonders darauf geachtet, dass es im gesamten Schlauchsystem keine Luftblasen gab, die die Endothelzellschicht hätten beschädigen können. Die efferenten Schläuche und Dreiweghähne wurden in einen Messbecher geführt, so dass sich das ausströmende Medium dort sammelte. Hierdurch konnten nach dem Experiment der genaue Volumenstrom und bei bekanntem Gefäßdurchmesser die im Gefäß aufgetretenen Scherkräfte berechnet werden. Die Pumpe wurde standardmäßig auf 20 mmHg eingestellt, was je nach Gefäß einen Volumenstrom von ca. 300-700 µl/min ergab. Durch Anpassen des Pumpen-

drucks wurde versucht, bei allen Gefäßen einen annähernd gleichen Volumenfluss einzustellen. Über den dritten, unbesetzten, Port des afferenten Dreiwegehahns konnten retrograd Stimulanzien, isolierte Blutzellen wie Monozyten (total ca. 6×10^6) und Thrombozyten (total ca. $5-10 \times 10^7$) oder Färbelösungen mithilfe einer 1 ml Spritze appliziert werden. Die Applikation entgegen der Flussrichtung erfolgte, um das Gefäß keinem erhöhten Druck auszusetzen. War die Perfusion 5 min nach retrograder Applikation der letzten Blutzellen oder Färbelösung abgeschlossen, wurde das Gefäß fixiert. Dazu wurde eine zweite, auch im Inkubator befindliche, Flasche mit Perfusionslösung (je nach Gebrauch Zink-, Methanol- oder Formalin-Fixierlösung, Tabelle 27 - Tabelle 29, Seite 34 - 34) an den afferenten Dreiwegehahn angeschlossen. Eine zweite Pumpe, die analog zur ersten funktionierte, perfundierte das Gefäß mit der Fixierlösung aus der zweiten Flasche. Das Medium im Organbad wurde per Pipette abgesaugt und durch Fixierlösung ersetzt, so dass das Gefäß gleichzeitig von innen und außen ohne Strömungsunterbruch und Gefäßspannungsverlust fixiert wurde. Nach 20-30 Minuten Fixation wurde der Fluss gestoppt und das Gefäß mit einer Pinzette von den Kapillaren abgezogen.

3.8.3. Fluoreszenzfärbung nach Gefäßperfusion

Die Fluoreszenzfärbung von perfundierten und fixierten Gefäßen (Kapitel 3.8.2, Seite 69) begann, abhängig von der verwendeten Fixiermethode, mit dem Rehydrieren und Waschen des Gefäßes. In allen Fällen erfolgten die nachfolgenden Schritte in den Vertiefungen von 24er Mikrotiterplatten. Bei Wasch- und Inkubationsschritten wurde die Mikrotiterplatte jeweils bei RT auf einem Orbitalschüttler geschwenkt (40 rpm). Befanden sich im Gefäß lichtempfindliche Farbstoffe wurde die Mikrotiterplatte mit Alufolie umwickelt.

Nach Zink-Fixierung wurde das Gefäß erst zweimal 5 min in 500 µl sterilem Wasser und dann einmal 10 min lang mit 500 µl PBS-TD (Tabelle 32, Seite 35) gewaschen.

Nach Formalin-Fixierung wurde das Gefäß dreimal je 10 min lang mit 500 µl PBS-TD gewaschen.

Nach Methanol-Fixierung wurde das Gefäß 10 min lang in 500 µl 75 % Methanol in PBS, dann 50 % Methanol in PBS, dann 25 % Methanol in PBS und zum Schluss in PBS-TD gewaschen.

Die weitere Färbung erfolgte anschließend unabhängig von der benutzten Fixiermethode. Das Gefäß wurde während 1 h in 500 µl Blockierlösung (Tabelle 33, Seite 35) blockiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper 1:100 in 400 µl Blockierlösung über Nacht bei RT. Der Primärantikörper war je nach Verwendungszweck Maus anti-CD31 für Endothel-

färbung, Kaninchen anti-vWF für ULVWF-Multimer-Färbung, Ratte anti-F4/80 für Makrophagen- und Monozytenfärbung oder eine Kombination daraus für Mehrfachfärbungen. Nach der Primärantikörperfärbung wurde das Gefäß sechsmal 30 min lang mit jeweils 500 µl PBS-TD gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper 1:200 in 400 µl Blockierlösung über Nacht bei RT. Der Sekundärantikörper richtete sich nach dem Ursprungstier des Primärantikörpers und war jeweils mit Daylight405, Cy2, Cy3 oder Cy5 konjugiert. Nach der Sekundärantikörperfärbung wurde das Gefäß sechsmal 30 min lang mit jeweils 500 µl PBS-TD gewaschen. Falls erforderlich, erfolgte eine Kernfärbung mit DAPI 1:5.000 in 500 µl PBS-TD 30 min lang bei RT und anschließend dreimaliges 30-minütiges Waschen mit jeweils 500 µl PBS-TD. Zum Abschluss wurde das Gefäß in einem 40 µl Tropfen Mowiol auf einem Objektträger platziert, mit einem Deckglas bedeckt und festgedrückt. Es wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftbläschen im Mowiol befanden und dass das Gefäß nicht verdreht oder gefaltet war. Der Objektträger wurde mit Alufolie umwickelt und bis zum Mikroskopieren im Kühlschrank bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

3.8.4. Gefäßperfusion mit Stimulans, Monozyten und Thrombozyten

Bei der Gefäßperfusion mit Thrombozyten und Monozyten wurde das Gefäß für die Perfusion vorbereitet (Kapitel 3.8.1, Seite 67). Gleichzeitig wurden Thrombozyten (Kapitel 3.2.4, Seite 47) und Monozyten (Kapitel 3.2.5, Seite 48) isoliert und gefärbt. Da die Isolierung und Färbung von Monozyten länger als die Gefäßpräparation dauerte, wurde in der Zwischenzeit das Gefäß im Inkubator bei 20 mmHg mit DMEM perfundiert (Kapitel 3.8.2, Seite 69). Waren alle Bestandteile bereit, wurde die Perfusionslösung von DMEM zu DMEM mit 0,1 µg/ml sCD40L als Stimulans gewechselt und das Gefäß 5 min lang perfundiert. Währenddessen wurden die Thrombozyten und Monozyten 1:1 (v/v) mit DMEM mit 0,1 µg/ml sCD40L verdünnt und 5 min lang bei 37 °C stimuliert. Für die Kernfärbung wurden 400 µl DMEM mit 40 µl NucBlue versetzt, mit einer Spritze retrograd über den afferenten Dreiwegehahn ins Schlauchsystem gegeben und das Gefäß 2 min lang mit dieser Lösung perfundiert. Bei einem Volumenstrom von ca. 300-700 µl/min passierten die 400 µl der hinzugegebenen Lösung das Gefäß in dieser Zeit restlos und weitere Lösungen konnten hinzugegeben werden, ohne dass es zu ungewollten Interaktionen kam. Als nächstes wurden 400 µl Thrombozyten in DMEM mit sCD40L retrograd ins Schlauchsystem gegeben und das Gefäß 2 min lang damit perfundiert. Zum Schluss wurden 400 µl Monozyten in DMEM mit sCD40L retrograd ins Schlauchsystem gegeben und das Gefäß 5 min lang damit perfundiert. Danach erfolgte die Fixierung des Gefäßes mit Zink-Fixierlösung (Kapitel 3.8.2, Seite 69).

Erfolgte die Perfusion des Gefäßes mit Thrombozyten und Monozyten unter nicht stimulierten Bedingungen, so wurde kein sCD40L ins DMEM für das Gefäß, die Thrombozyten und Monozyten gegeben. Ansonsten wurde die Perfusion, wie unter stimulierten Bedingungen beschrieben, durchgeführt.

Nach dem Fixieren wurde das Gefäß dreimal je 5 min lang mit sterilem Wasser gewaschen und dann direkt ohne weitere Färbung eingedeckelt (Kapitel 3.8.3, Seite 70).

3.8.5. Mikroskopaufnahmen von perfundierten Gefäßen

Fluoreszenz gefärbte (Kapitel 3.8.3, Seite Seite 70) oder mit Fluoreszenz gefärbten Thrombozyten und Monozyten perfundierte Gefäße (Kapitel 3.8.4, Seite 71) wurden nach ihrer Färbung mit einem konfokalen Mikroskop analysiert. Dazu wurde der Objektträger mit dem Gefäß auf dem Objekttisch platziert und beleuchtet. Die Anfertigung von Aufnahmen erfolgte mit der Mikroskop Software xcellence rt. Von jedem Gefäß wurde mit dem 10er Objektiv eine Übersicht erstellt. Für die Übersichtsaufnahme des gesamten Gefäßes wurden einzeln aufgenommene Bilder mit der Bildbearbeitungssoftware ImageJ und dem Plugin MosaicJ zusammengefügt. Dies wurde in den Kanälen Blau (Kernfärbung), Grün (Autofluoreszenz), Rot (CD31 oder Monozyten) und Hellrot (vWF) gemacht, je nach verwendeten Farbstoffen. Für detailliertere Ansichten wurden das 20er und 40er Objektiv verwendet.

3.8.6. Berechnung der Perfusionsschubspannung

Anhand von Gefäßübersichtsaufnahmen (Kapitel 3.8.5, Seite 72) erfolgte die Bestimmung des Durchmessers des Gefäßes in ImageJ mithilfe der Distanzmessfunktion. Zusammen mit dem nach der Perfusion gemessenen Volumenfluss konnte dadurch die im Gefäß aufgetretene Schubspannung berechnet werden. Dazu wurde die folgende Formel verwendet, wo τ die Schubspannung in Dyn pro Quadratzentimeter, η die Viskosität der Flüssigkeit in Pascal mal Sekunde, Q die Perfusionsrate in Kubikmeter pro Sekunde und r der Radius des Gefäßes in Meter ist:

$$\tau = \frac{4\eta Q}{\pi r^3}$$

Beim Einsetzen der Werte musste auf den Gefäßradius geachtet werden. Beim Betrachten der Aufnahmen konnte nicht eindeutig festgestellt werden, ob das Gefäßlumen durch das Fixieren auf dem Objektträger flachgedrückt war oder

nicht. In ersterem Fall würde der gemessene Gefäßdurchmesser nur dem halben Gefäßumfang entsprechen, in letzterem jedoch dem wahren Gefäßdurchmesser, siehe Abbildung 12, Seite 73 zur Illustration. Da die tatsächliche Gefäßstruktur jeweils zwischen diesen zwei Extremzuständen lag, wurde aus dem gemessenen Gefäßdurchmesser jeweils der minimal und maximal mögliche Wert für den Radius bestimmt und daraus die geringstmögliche und maximal erreichbare Schubspannung berechnet und als Bereich angegeben.

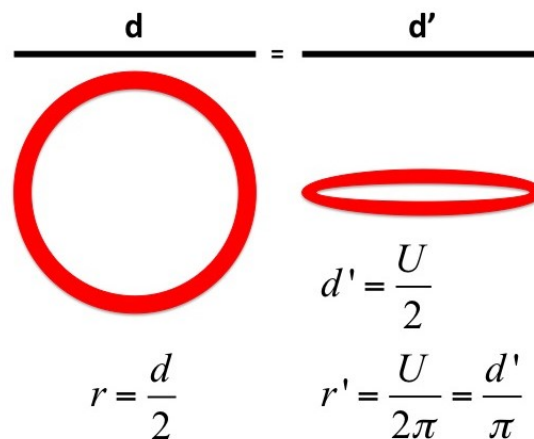


Abbildung 12: Bestimmung des Gefäßradius

Bei der Bestimmung des Gefäßradius kommt es darauf an, ob das Gefäßlumen ausgedehnt ist (links) oder flachgedrückt (rechts). Die Gefäße (rot) sind hier im Querschnitt dargestellt und können leicht unterschieden werden. Betrachtet man sie jedoch von oben, wie beim Mikroskopieren, so haben die unterschiedlichen Gefäße vermeintlich den gleichen Durchmesser (d, d'). Ist das Lumen ausgedehnt, so entspricht der gemessene Durchmesser (d) dem doppelten Radius (r). Ist das Lumen jedoch zusammengedrückt, so entspricht der gemessene Durchmesser (d') dem halben Umfang (U). Durch Umformen der Kreisgleichung kann daraus der Radius (r') dieses Gefäßes bestimmt werden.

3.8.7. Auswertung der Gefäßperfusion

Gefäßübersichtsaufnahmen (Kapitel 3.8.5, Seite 72) von mit gefärbten Monozyten perfundierten Gefäßverzweigungen wurden in PowerPoint dargestellt und in Excel ausgewertet. Dazu wurde die Anzahl und Position aller im Gefäß anhaftenden Monozyten in eine Gefäßskizze in PowerPoint übertragen. Dies wurde individuell für alle Gefäße durchgeführt. Für Gefäße aus der gleichen Kategorie (gleicher Genotyp und stimuliert respektive nicht-stimuliert) wurden die ausgefüllten Gefäßskizzen übereinander gelegt, um eine zusammenfassende Bindungspositionsskizze der Monozytenbindung im Gefäß zu erzeugen. Parallel dazu wurden die Daten in Excel erfasst. Dabei wurde vermerkt, ob die Monozyten vor oder nach der Gefäßverzweigung anhafteten. So konnten Unterschiede zwischen stimulierten und nicht-stimulierten Kontrollen, verschiedenen Genotypen der Mäuse und den bevorzugten Bindungspositionen der Monozyten statistisch erfasst werden.

3.8.8. Visualisierung des Strömungsprofils in der Karotisverzweigung

Der Fluss in der Gefäßverzweigung wurde mithilfe des PSI Systems (Kapitel 3.6.2, Seite 61) visualisiert. Hierbei wurde die PeriCam auf die Gefäßverzweigung in der Perfusionsplattform gerichtet. Da die PeriCam den Fluss anhand der Streuung eines Lasers an Erythrozyten erkennt, musste Blut als Perfusionslösung verwendet werden. Zur Darstellung des Strömungsprofils während der Perfusion wurden größere Mengen an Blut (20 ml) benötigt, deshalb wurde humanes Vollblut (Kapitel 3.7.2, Seite 64) anstelle von Mausblut verwendet. Durch Höhenverstellung des Reservoirs mit Perfusionslösung konnte der Druck und damit der Blutfluss (200-400 $\mu\text{l}/\text{min}$) verändert werden. Verschiedene Flussgeschwindigkeitsbedingungen, Unterbrechung und Wiederaufnahme des Flusses wurden aufgezeichnet (44 Bilder/s). Mithilfe des PIMSoft Programmes wurden 10 aufeinanderfolgende Bilder gemittelt und so die Aufnahmen geglättet. Hierdurch war es möglich, verschiedene Flussprofile in der Gefäßverzweigung darzustellen.

3.9. Statistik

Statistische Auswertungen von mit ImageJ erhobenen Daten erfolgten in Microsoft Excel. Wenn nicht anders erwähnt, wurde in Abbildungen der Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Dabei wurde die Standardabweichung s des Mittelwerts \bar{x} der Einzelwerte x_i mittels folgender Formel berechnet, wobei n die Anzahl der Einzelwerte ist:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Die Standardabweichung der Mittelwertdifferenz $s_{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}$ wurde aus den zuvor berechneten Standardabweichungen der einzelnen Mittelwerte s_{x_i} und der Anzahl Einzelwerte n_i mit folgender Formel berechnet:

$$s_{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)} = \sqrt{\frac{s_{x_1}^2}{n_1} + \frac{s_{x_2}^2}{n_2}}$$

Statistische Signifikanzwerte wurden in Excel mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test ermittelt. Dabei wurde ein p-Wert von $< 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet und mittels Sternchen markiert. In Abbildungen wurde * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$ verwendet. Knapp nicht statistisch signifikante Werte ($0,06 > p > 0,05$) wurden mit Klammern (*) markiert.

4. Ergebnisse

4.1. Endothelialer CD40-Knockout und Atherosklerose

4.1.1. Charakterisierung der induzierbaren endothelialen CD40-KO Maus

Zur Untersuchung des Einflusses von endotheliale CD40 auf die Entwicklung der Atherosklerose in der Abteilung ein neues Mausmodell generiert. Die Mauslinie CD40^{fllox/flox} x Tie2-CreERT2 x ApoE^{-/-} vereinigt dabei die spontane Bildung von atherosklerotischen Plaques (ApoE^{-/-}) mit der Induzierbarkeit des endothelialen CD40-Knockouts (Kapitel 2.8, Seite 40).

Der Nachweis des CD40-KO erfolgte mittels PCR von cDNA aus pulmonalen Endothelzellen mit und ohne Tamoxifen-Induktion. Dabei wurden ein Vorwärts- und drei Rückwärtsprimer für die nachzuweisende Depletion von Exon 7 und Exon 8 verwendet. Der Vorwärtsprimer bindet vor und die Rückwärtsprimer binden vor, in und nach der auszuschneidenden Sequenz (Abbildung 13, Seite 75). Hierdurch ergab sich ein Muster von drei unterschiedlich langen Banden bei den Kontrolltieren. Bei den Tamoxifen behandelten Tieren wäre das Wegfallen der Bande des in der auszuschneidenden Sequenz ansetzenden Primers und eine Verschiebung der Bande des nach der auszuschneidenden Sequenz ansetzenden Primers zu erwarten gewesen (Abbildung 13, Seite 75).

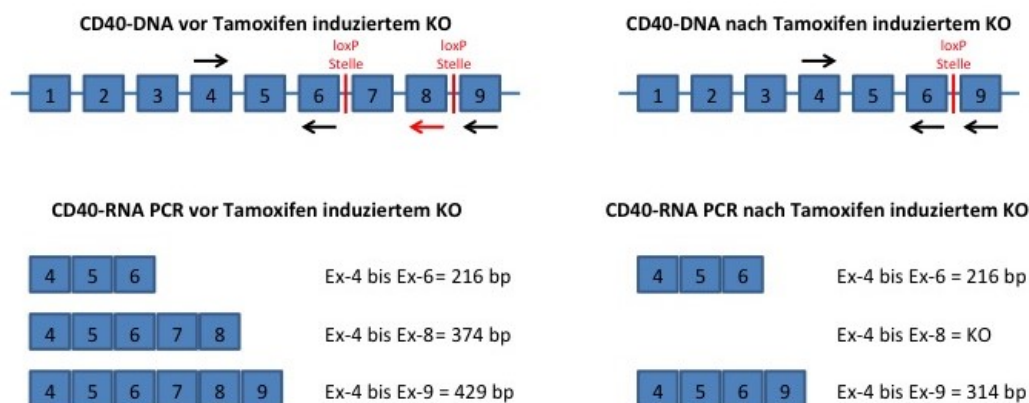


Abbildung 13: Aufbau des CD40-Gens

Das CD40 Gen verfügt über 9 Exons (blaue Quadrate) und dazwischenliegende Introns (blaue Linien). Im Intron zwischen Exon 6 und 7 sowie zwischen Exon 8 und 9 befinden sich die loxP Stellen zur späteren Rekombination. Ein Vorwärtsprimer in Exon 4 und jeweils ein Rückwärtsprimer in Exon 6, 8 und 9 führen zu PCR Produkten in unterschiedlicher Länge. Anhand des Vorhandenseins und der Länge der PCR Produkte kann der Erfolg des Tamoxifen-induzierten endothelialen CD40-KO nachgewiesen werden.

Abbildung 14, Seite 76 zeigt, dass durch Tamoxifen-Verabreichung keine spezifische Depletion von Exon 8 und Exon 9 nachweisbar war.

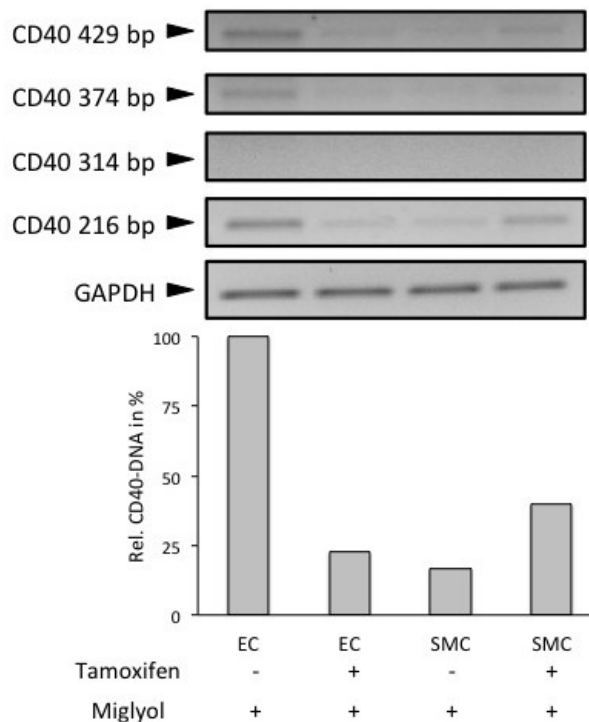


Abbildung 14: CD40-PCR zur Verifizierung des induzierbaren endothelialen CD40-KO

Exemplarische CD40-PCR ($n = 1$) von pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen und SMCs aus der Aorta mit GAPDH als Ladekontrolle (26 PCR Zyklen, 10 ng cDNA pro Probe). Intensitäten der CD40-PCR-Banden verschiedener Größe (aufgrund der verschiedenen verwendeten Primerpaare) in einer Spalte wurden aufsummiert und mittels Intensität der GAPDH-Bande normalisiert. Verglichen wurden Zellen aus Tieren, bei denen mittels Verabreichung von Tamoxifen in Miglyol der KO induziert wurde und Zellen aus Kontrolltieren, denen nur Miglyol verabreicht wurde. In Endothelzellen war nach Induzierung des KO weniger CD40 nachweisbar, jedoch keine Veränderung der Bandengröße, wie aufgrund der Rekombination nach Induzierung zu erwarten gewesen wäre (Abbildung 13, Seite 75).

Die 429 bp- und 374 bp-Banden in Endothelzellen waren zwar nach Tamoxifen-Verabreichung reduziert, jedoch ebenso die 216 bp-Bande die unverändert hätte bleiben sollen. Zusätzlich war keine 314 bp-Bande nachweisbar, die nach Ausschneiden der loxP-markierten Gensequenz hätte entstehen müssen. Insgesamt war nach Tamoxifen-Verabreichung nur eine Reduzierung der gesamten CD40-DNA um ca. 75 % feststellbar. Bei SMCs waren die 429 bp-, 374 bp- und 216 bp-Banden sowohl mit als auch ohne Tamoxifen-Verabreichung in ungefähr gleichem Masse vorhanden, der Knockout betrifft SMCs also nicht.

Der Nachweis des KO mittels WB erfolgte mit Proteinproben aus pulmonalen Endothelzellen mit und ohne Tamoxifen-Induzierung. Entgegen der Erwartung war nach Tamoxifen-Induzierung keine verminderte CD40-Expression feststellbar (Abbildung 15, Seite 77).

Da sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene die Induzierbarkeit des endothelialen CD40-Knockouts nicht verifiziert werden konnte, wurde die Mauslinie für die geplanten weiteren Experimente nicht verwendet.

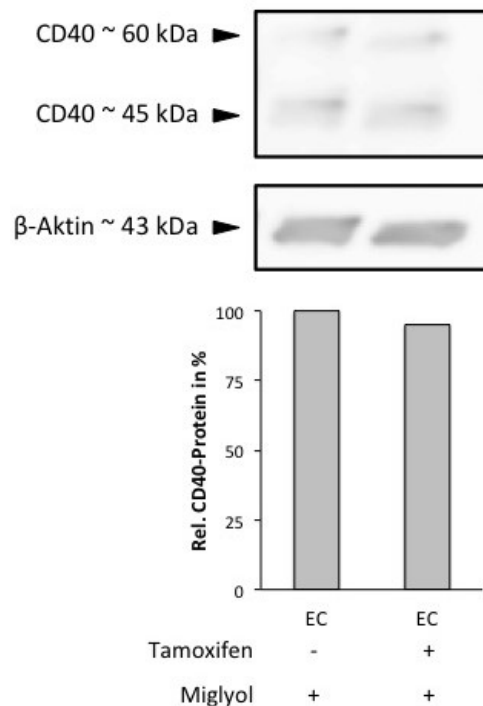


Abbildung 15: CD40-Protein Western Blot zur Verifizierung des endothelialen CD40-KO

Exemplarischer CD40-WB (n = 1) von pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen mit β-Aktin als Ladekontrolle. Intensitäten der CD40-WB-Banden verschiedener Größe (45 kDa Bande = erwartete Proteingröße, 60 kDa Bande = vermutliche Isoform) in einer Spalte wurden aufsummiert und mittels Intensität der β-Aktin-Bande normalisiert. Verglichen wurden Zellen aus Tieren, bei denen mittels Verabreichung von Tamoxifen in Miglyol der KO induziert wurde und Zellen aus Kontrolltieren, denen nur Miglyol verabreicht wurde. In Endothelzellen war nach Induzierung des KO keine ausreichende Depletion von CD40 feststellbar.

4.1.2. Darstellung von Plaques via Ultraschall

Die Ultraschalluntersuchung ermöglicht eine fortlaufende, nicht-invasive Betrachtung derselben Versuchstiere über einen langen Zeitraum. Sie stellt eine geeignete Methode dar, um aussagekräftige Resultate über die Bildung und das Voranschreiten von atherosklerotischen Plaques im Aortenbogen, in seinen Abgängen und in den Karotiden zu erhalten. Mit der Ultraschallsoftware konnten in Aufnahmen sowohl die Umrisse der Aorta als auch die der Plaques eingezeichnet und daraus ein 3D-Modell generiert werden (siehe Abbildung 16, Seite 78). Damit war auch eine Berechnung des Plaquevolumens möglich.

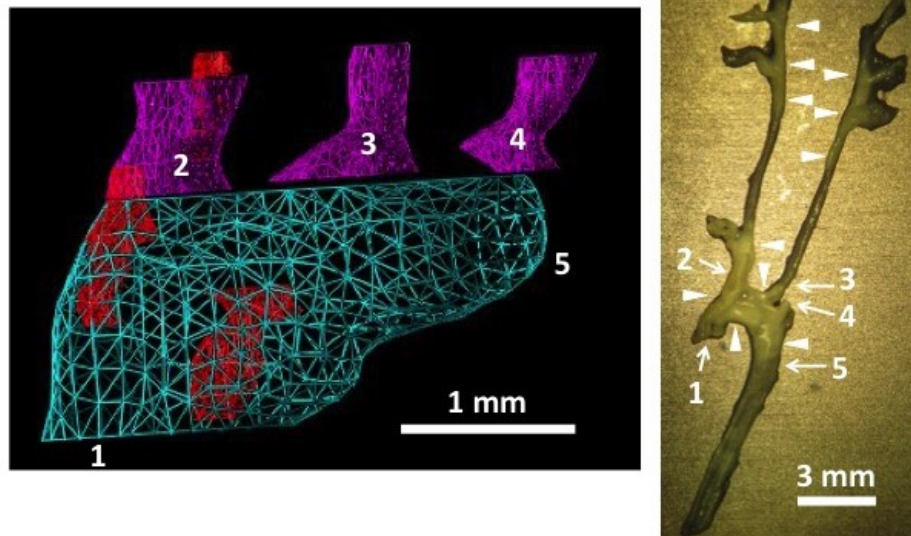


Abbildung 16: 3D Ultraschallmodell eines Aortenbogens mit atherosklerotischen Plaques

3D Modell des Aortenbogens (links) in Türkis von der aufsteigenden (1) bis zur absteigenden Aorta (5) mit den drei Abgängen *Truncus brachiocephalicus* (2), *Arteria carotis communis sinistra* (3) und *Arteria subclavia sinistra* (4) in Lila. Im Gefäß enthaltene atherosklerotische Plaques der 15 Monate alten ApoE-KO Maus sind in Rot dargestellt. Das Modell wurde mit der Software des Vevo 2100 Ultraschallgerätes erzeugt. Die Aorta, von der das Ultraschallmodell stammt, wurde inklusive Karotiden freipräpariert (rechts). Die im Gefäß weißlich erscheinenden Plaques sind mit Pfeilköpfen markiert.

Die Visualisierung der Plaques in alten Tieren (>1 Jahr) war erfolgreich und ermöglichte in diesem Stadium ein kontinuierliches Beobachten. Ein Voranschreiten der Plaqueentwicklung war in diesem Stadium aber nicht mehr zu erwarten. Plaques waren erst im fortgeschrittenen Stadium deutlich erkennbar, diese Arbeit fokussierte sich jedoch auf die Anfangsphase der Atherosklerose. Beim Sezieren der Maus war auch mit bloßem Auge eine viel größere Plaquebelastung sichtbar als mit dem Ultraschallgerät (Abbildung 16, Seite 78). Daher wurde angenommen, dass bei jüngeren Tieren mit schwächer ausgeprägten Plaques die Erkennbarkeit mittels Ultraschall noch geringer sei. Folglich wurde eine Methode zur Plaquevisualisierung verwendet, die auch schon in der Frühphase der Atherosklerose Läsionen deutlich visualisiert (Kapitel 4.1.3, Seite 78).

4.1.3. Darstellung von Plaques via Oil Red O-Färbung

Mithilfe des fettlöslichen Azofarbstoffs ORO lassen sich die Einlagerungen von Lipiden in die Gefäßwand und somit die frühe Phase der Plaquebildung nachweisen. In Abbildung 17, Seite 79 ist dieselbe 15 Monate alte Aorta zu sehen wie die mit dem Ultraschallgerät aufgenommen in Abbildung 16, Seite 78. Mit der ORO-Färbung ist im Vergleich zur Ultraschallbildgebung eine genauere

Darstellung der Plaques möglich, da auch sehr kleine Lipideinlagerungen dargestellt werden können. Weil die ORO-Färbung nur final vollzogen werden kann, ist damit keine kontinuierliche Beobachtung der Plaqueentwicklung wie bei der Ultraschallbildgebung möglich.

Mittels der Software ImageJ konnte auch die Plaquefläche bei ORO-Färbungen bestimmt werden. Die in Abbildung 17, Seite 79 abgebildete Aorta hat Plaques mit einer Fläche von 12,24 mm², was in diesem Fall 28,37 % der Gesamtfläche entspricht.

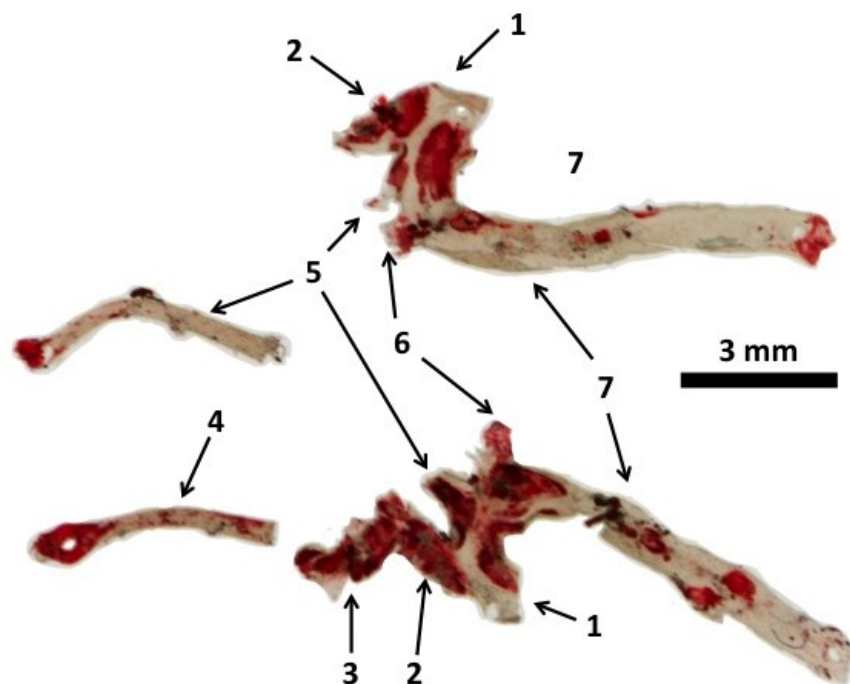


Abbildung 17: Oil Red O-Färbung einer Aorta mit atherosklerotischen Plaques

ORO-Färbung derselben Aorta aus einer 15 Monate alten ApoE-KO Maus wie in Abbildung 16, Seite 78. Die Karotiden wurden abgetrennt und die Aorta aufgeschnitten und auseinander geklappt. Die rote ORO-Färbung zeigt deutlich die Plaques im Aortenbogen und in den Abgängen zu den Karotiden. Dargestellt sind aufsteigende Aorta (1), Truncus brachiocephalicus (2), Arteria subclavia dextra (3), Arteria carotis communis dextra (4), Arteria carotis communis sinistra (5), Arteria subclavia sinistra (6) und absteigende Aorta (7).

4.1.4. CD40-Proteinnachweis in Aorten und Zellkulturen

Es sollte gezeigt werden, dass an den üblichen Entwicklungsstellen von atherosklerotischen Plaques in ApoE-KO Tieren das CD40-Protein auf Endothelzellen verstärkt präsent ist. Dazu wurden Cryo- und Paraffinschnitte vom Aortenbogen und dem Bereich der Abgänge von ApoE-KO Tieren angefertigt. Aufgrund des natürlichen geringen Vorhandenseins von CD40, ca. $5 \cdot 10^3$ Kopien pro Zelle (Karmann *et al.*, 1995), konnte jedoch keine überzeugende positive CD40-Färbung in diesen Gewebeschnitten erzielt werden.

Alternativ wurde versucht, die CD40-Expression auf der Zelloberfläche durch Stimulation mit Zytokinen zu steigern. Dazu erfolgte eine 8-stündige Inkubation von kultivierten murinen pulmonalen Endothelzellen mit 100 U/ml TNF- α und 1.000 U/ml IFN- γ und nach der Stimulation die Fluoreszenzfärbung der Zellen. Es konnte jedoch keine CD40-Färbung auf der Zelloberfläche erzielt werden. Auch eine aufgrund des verwendeten Verstärkers sensitivere HRP-Färbung blieb erfolglos.

4.1.5. Einfluss von CD40 auf die Arteriogenese

Bei der Arteriogenese vergrößern schon bestehende kleine Blutgefäße ihren Durchmesser durch Umbau und Wachstum, um die Blutversorgung des Gewebes distal eines Gefäßverschlusses wiederherzustellen. Bei diesem Vorgang treten wie bei der Atherosklerose Entzündungsreaktionen auf, in Folge derer Monozyten ins Gewebe rekrutiert werden. Deshalb sollte mit dem induzierbaren endothelialen CD40-KO Mausmodell der Einfluss von CD40 auf die Arteriogenese untersucht werden.

Die Arteriogenese wurde induziert, indem im Ohr der Maus eine Verästelung der *Arteria auricularis caudalis*, abgebunden wurde. Als Folge davon weiteten sich die vorhandenen Arteriolen und stellten die Blutversorgung wieder her. Die grundlegenden Schritte zur Beobachtung und Quantifizierung der Arteriogenese und einer damit zusammenhängenden Rekrutierung von Monozyten wurden etabliert (Kapitel 4.1.6, Seite 80 bis Kapitel 4.1.8, Seite 82). Die geplanten Experimente konnten jedoch wegen des nicht funktionierenden induzierbaren endothelialen CD40-KO Mausmodells nicht durchgeführt werden.

4.1.6. Darstellung der Arteriogenese mittels Blutflussmessung

Das erfolgreiche Abbinden einer Verästelung der *Arteria auricularis caudalis* im Mausohr wurde durch Anfertigung von Übersichtsaufnahmen des Ohrs und Messung des Blutflusses mithilfe des PeriCam PSI Systems über 7 Tage hinweg dokumentiert. Der Entwicklungsverlauf der Arteriogenese ist in Abbildung 18, Seite 81 dargestellt. Die Übersichtsaufnahmen zeigen die vorgenommene Gefäßligatur, während die PSI Aufnahmen die temporäre Unterbindung der Durchblutung und die spätere Wiederherstellung derselben durch die sich weitenden Arteriolen dokumentieren. Das PSI System eignete sich somit, um den Erfolg der Gefäßligatur zu zeigen und den Fortschritt der Arteriogenese zu verfolgen. Generell ist LSCI in der Lage, zwischen den langsameren Strömungsgeschwindigkeiten des Blutes in den Venen und den schnelleren in den Arterien zu unterscheiden. Im Mausohr liegen die Arterien und Venen allerdings so eng beieinander, dass unter diesen Bedingungen mit dem PSI System eine separate Darstellung nicht möglich war. Somit konnte durch die Messung des Blutflusses

nur das Auslösen der Arteriogenese bestätigt werden. Für genauere Analysen war dieses Vorgehen jedoch leider ungeeignet.

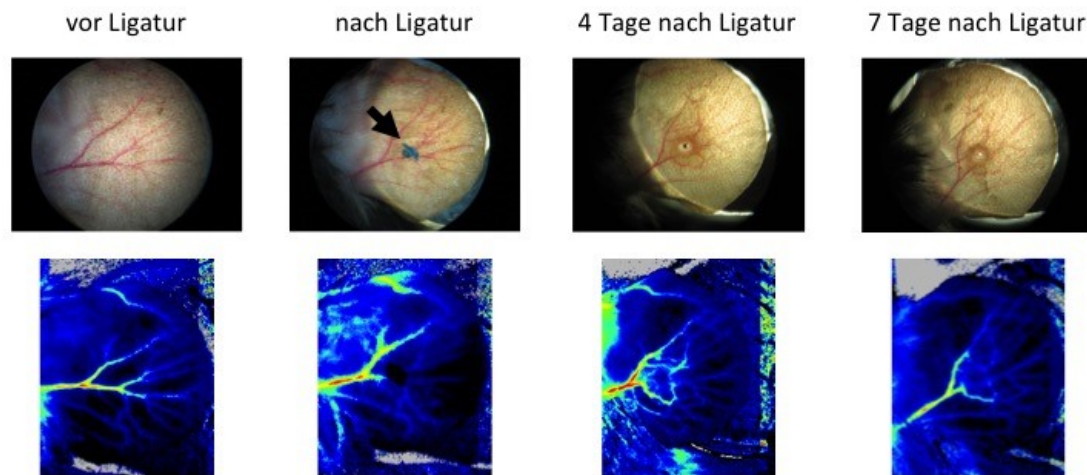


Abbildung 18: Durchblutung des Mausohrs vor und nach Gefäßligatur

Übersichtsaufnahmen (oben) mittels Mikroskopkamera und Blutflussaufnahmen (unten) mittels PeriCam PSI System eines Mausohrs vor und nach dem Abbinden einer Verästelung der *Arteria auricularis caudalis*. Zwischen Tag 0 und 4 nach dem Abbinden der Arterie hatte die Maus den Ligaturfaden (schwarzer Pfeil) selbst entfernt. Nach der Ligatur ist ein Ausbleiben der Durchblutung im Bereich nach der Ligatur ersichtlich. Nach einigen Tagen ist eine erneute Durchblutung aufgrund von Arteriogenese erkennbar.

4.1.7. Darstellung der Arteriogenese mittels Partikelfärbung

Um die morphologischen Auswirkungen der Arteriogenese auf die Arteriolen aufzuzeigen, mussten diese visualisiert werden. Hierzu wurde das Gefäßsystem einer Maus 7 Tage nach der Ligatur von der arteriellen Seite her mit Farblösung perfundiert. Da die Farbpartikel zu groß waren, um von den Arteriolen durch die Kapillaren in die Venolen zu gelangen, wurden so ausschließlich die Arterien angefärbt. Nach Aufhellen des Ohrs mithilfe von H_2O_2 , Benzylalkohol und Benzylbenzoat waren die Arterien somit klar sichtbar, so dass der Gefäßdurchmesser bestimmt werden konnte. Arteriolen nach arteriogenem Umbau waren leicht an ihrer Schlängelung erkennbar. Der Gefäßdurchmesser wurde durch Arteriogenese beinahe verdoppelt (Abbildung 19, Seite 82).

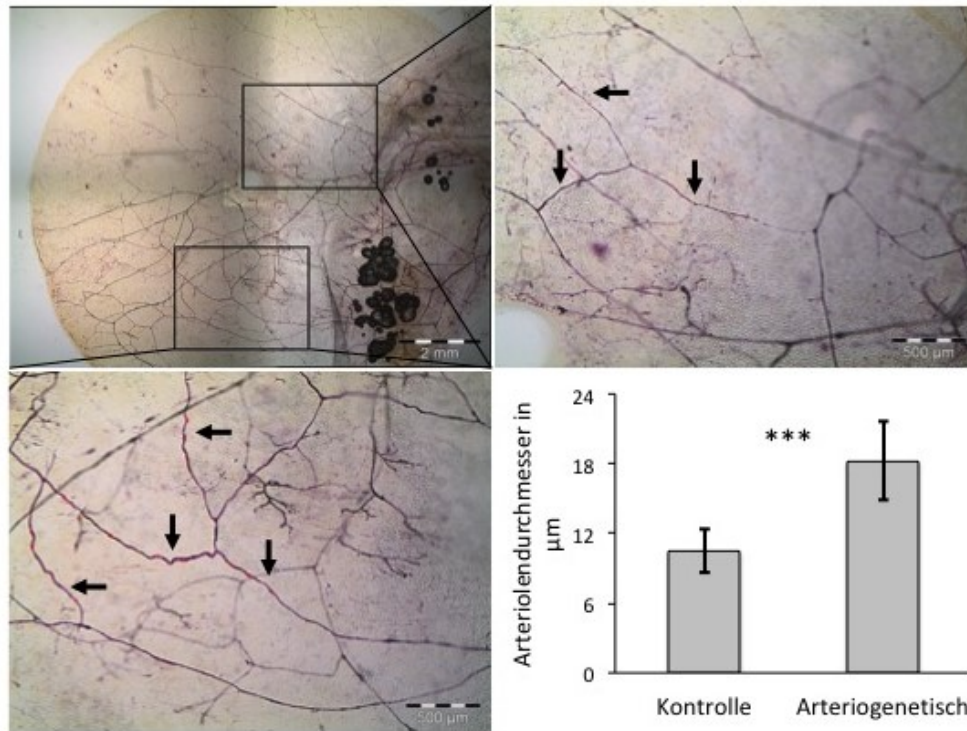


Abbildung 19: Einfluss der Arteriogenese auf den Durchmesser von Arteriolen im Mausohr

Die Arterien einer Maus wurden 7 Tage nach Ligatur einer Ohrarterie mit roten Farbpartikel durchgespült, um die Arteriolen anzufärben. Oben links: Übersichtsaufnahme des Ohres mit Ort der Ligatur in der Mitte des Ohres (Messbalken 2 mm). Oben rechts: Vergrößerte Aufnahme von Kontroll-Arteriolen (schwarze Pfeile, Messbalken 500 µm). Unten links: Vergrößerte Aufnahme von Arteriolen nach arteriogenem Umbau (schwarze Pfeile, Messbalken 500 µm). Bei Arteriolen, welche die Arteriogenese durchlaufen haben, ist eine Schlingelung und Vergrößerung des Gefäßdurchmessers ersichtlich. Unten rechts: Die Durchmesseränderung zwischen Kontroll-Arteriolen ($n = 11$) und Arteriolen nach arteriogenem Umbau ($n = 15$) beträgt $+7,77 \pm 1,03$ µm, was 74 ± 10 % entspricht, und ist hoch signifikant ($p < 0,001$).

4.1.8. Einfluss von CD40 auf die Monozyteninfiltration bei Arteriogenese

Um den Einfluss des endothelialen CD40-Knockouts auf die Arteriogenese aufzuzeigen, sollte die Migration von Monozyten in Blutgefäßen, die eine Arteriogenese durchgemacht haben, untersucht werden. Dazu wurden Gefäße, die mittels Partikelfärbung als von arteriogenem Umbau betroffen identifiziert wurden, aus dem Ohr ausgeschnitten, in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit dem Maus Makrophagen Marker F4/80 angefärbt. Das F4/80 Epitop ist zwar hauptsächlich auf Makrophagen vorhanden, in geringerem Ausmaße aber auch auf Monozyten nachweisbar (Austyn und Gordon, 1981). Bei *in vitro*-Differenzierung von murinen Monozyten zu Makrophagen waren nach 7 Tagen ca. 70 % der Monozyten differenziert (Francke *et al.*, 2011). Somit kann davon ausgegangen werden, dass 7 Tage nach der Ligatur und einsetzender

Einwanderung der Monozyten ins Gewebe die meisten davon zu Makrophagen differenziert sind, was die Verwendung von F4/80 rechtfertigte. Nur bei vom arteriogenem Umbauprozess betroffenen Arteriolen konnte durch Fluoreszenzfärbung das Vorhandensein von Monozyten und Makrophagen nachgewiesen werden (Abbildung 20, Seite 83). Die F4/80 Färbung hätte somit einen Vergleich von Gefäßen mit endotheliale CD40-Knockout und Wildtyp-Gefäßen nach Arteriogenese ermöglicht, wurde jedoch wegen des Scheiterns des induzierbaren endothelialen CD40-Knockouts *in vivo* nicht durchgeführt.

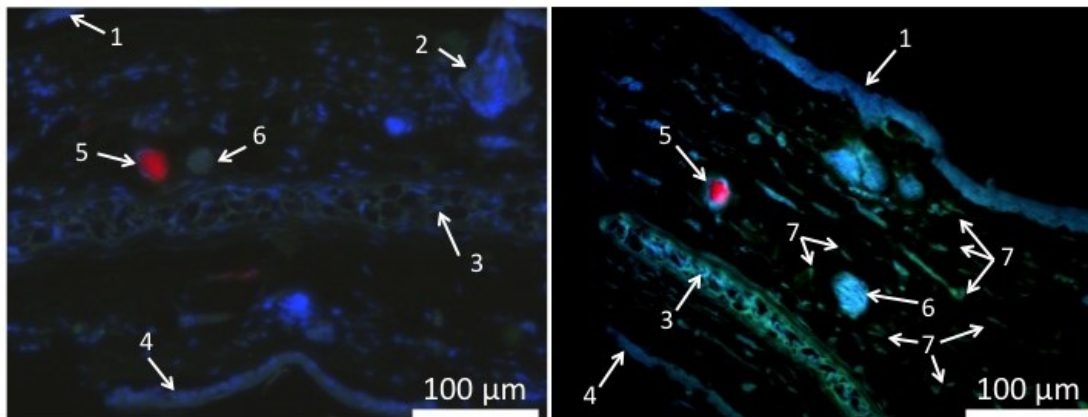


Abbildung 20: Monozyteninfiltration bei Arteriogenese

Fluoreszenzaufnahmen eines Querschnitts des Mausohrs mit Zellkernen (blau), Farbpartikeln zur Visualisierung der Arterien (rot) und Monozyten/Makrophagen (grün). Verglichen wird der Querschnitt von einem unbehandelten Kontrolltier (links) und einem Tier mit Arteriogenese durch Ligatur einer Verästelung der *Arteria auricularis caudalis* (rechts). Abgebildet sind die Epidermis der Oberseite des Ohrs (1) mit Haarwurzeln (2), das Knorpelgewebe (3), die Epidermis der Unterseite des Ohrs (4), Arteriolen mit Farbpartikeln (5), Venolen (6) und ins Gewebe eingewanderte Monozyten/Makrophagen (7).

4.2. Perfusion ibidi Slides

4.2.1. Etablierung

Um Endothel-Monozyten-Interaktionen zu untersuchen, wurden ibidi Perfusionslides verwendet. Wie in den Kapiteln 3.7.1, Seite 63 bis 3.7.3, Seite 65 beschrieben, wurden die Slides mit HUVECs besiedelt, bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert und anschließend mit isolierten und Fluoreszenzfarbstoffgefärbten humanen Thrombozyten und Monozyten in einer Erythrozytenlösung perfundiert. Nach erfolgreichem Experiment wurde die Intaktheit des Endothels mittels Phasenkontrastmikroskopie oder einer Postperfusionsfärbung (Kapitel 3.7.4, Seite 67) bestätigt. Die Postperfusionsfärbung zeigte nicht nur die Intaktheit des Endothels mittels positiver CD31-Färbung, sondern auch dessen Reaktionsfähigkeit auf sCD40L-Stimulation. Der von den stimulierten Endothelzellen ausgeschüttete vWF bildete unter Flussbedingungen die typischen fadenförmigen Strukturen der ULVWF-Multimere. Auch die

Kolokalisation von Thrombozyten und Monozyten mit den ULVWF-Multimeren konnte gezeigt werden (Abbildung 21, Seite 84). Es stellte sich jedoch heraus, dass bei der Postperfusionsfärbung viele ULVWF-Multimere mit adhätierenden Thrombozyten und Monozyten von den Endothelzellen abreißen. Dies schloss die Quantifizierung der Perfusionsversuche mittels Postperfusionsfärbung aus.

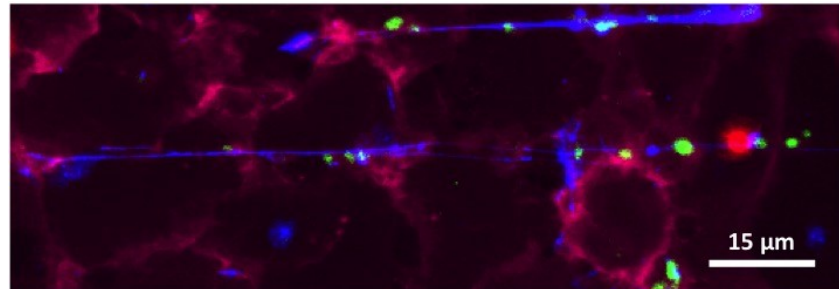


Abbildung 21: VWF- und CD31-Färbung eines ibidi Perfusionslide nach Perfusion

Fluoreszenzaufnahmen eines gefärbten ibidi Perfusionslide nach Perfusion mit Thrombozyten und Monozyten. Endothelzellen wurden mit CD31 (magenta), vWF mit vWF-AK (blau), Thrombozyten mit Calcein Grün (grün) und Monozyten mit CellTracker Red (rot) angefärbt. Thrombozyten und Monozyten binden an die von den Endothelzellen ausgeschütteten und durch den Fluss ausgestreckten ULVWF-Multimere.

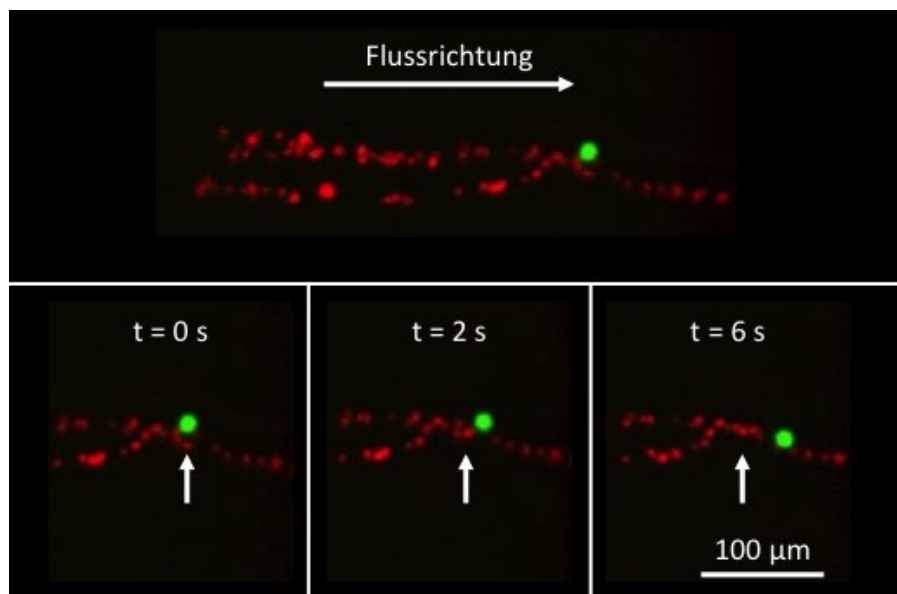


Abbildung 22: Fluoreszenzaufnahme eines rollenden Monozyten

Fluoreszenz-Live-Aufnahmen aus einem Perfusionslides, in dem nach sCD40L-Stimulation (0,1 µg/ml) ein Monozyt (grün) einen Thrombozyten (rot) besetzten ULVWF-Multimer entlang rollt. Oben ist das gesamte ULVWF-Multimer abgebildet, unten wird das Rollen des Monozyts von seiner Startposition (weißer Pfeil) über 6 Sekunden hinweg gezeigt.

Aufgrund der Instabilität der Monozyten und Thrombozyten bedeckten ULVWF-Multimere während der Postperfusionsfärbung wurden nur Live-Aufnahmen zur Auswertung verwendet. Diese ermöglichten eine artefaktfreie Abbildung der

Interaktionen von Endothelzellen und Blutbestandteilen. ULVWF-Multimere konnten auf diese Weise zwar nicht direkt visualisiert werden, aber durch die Fluoreszenz der anhaftenden Thrombozyten. Durch die Live-Aufnahmen konnte nicht nur das Adhärieren von Monozyten an mit Thrombozyten besetzten ULVWF-Multimeren nachgewiesen werden, sondern auch das Rollen eines Monozyten entlang desselben (Abbildung 22, Seite 84). Die Etablierung der Live-Aufnahmen jeglicher Interaktionen von Endothelzellen und Blutbestandteilen bildete die Grundlage für die Auswertung und Quantifizierung aller weiteren *in vitro*-Perfusionsversuche.

4.2.2. Etablierung des Transmigrationsslide

Zur Untersuchung der Adhäsion von Monozyten an die vaskuläre Endothelzellschicht und die anschließende Diapedese wurden Transmigrationsslide (Abbildung 9, Seite 64) verwendet. Die Slides enthielten zwei durch eine poröse Glasmembran voneinander getrennte Kanäle. Auf der Membran eines Kanals kultivierte HUVECs simulierten die Endothelzellschicht. Das in dem anderen Kanal vorgelegte Chemokin MCP-1, regte die an die Endothelzellschicht adhärierenden Monozyten zur Leukodiapedese an. Es war geplant, Anzahl der transmigrierten Monozyten und die präsentierten Oberflächenmarker zu bestimmen. Damit sollte die Frage geklärt werden, ob die Leukodiapedese die Differenzierung und Polarisierung zu einem pro- oder antientzündlichen Phänotyp beeinflusst. Zusätzlich war geplant, den Einfluss von CD40 auf die Leukodiapedese und Monozyten-Differenzierung mittels Depletion des endothelialen CD40-Rezeptors mithilfe von siRNA aufzeigen. Da es jedoch nicht möglich war, eine konfluente Endothelzellschicht auf der porösen Glasmembran im Slide zu kultivieren, wurden die Versuche nicht durchgeführt.

4.2.3. Effekt von sCD40L-Stimulation auf Monozytenbindung im Y-Slide

Das ibidi Y-Slide besteht aus einem Kanal, der sich in der Verzweigung in zwei divergierende Kanäle auftrennt, die wiederum nach einem Knick konvergieren und ab dem Zusammenschluss als ein Kanal weiter laufen (Abbildung 23, Seite 86). Hierdurch stellt es ein *in vitro*-Modell für eine Gefäßverzweigung dar. Der Einfluss von sCD40L auf die vWF Freisetzung und Monozytenadhäsion an die Endothelzellschicht wurde hiermit sowohl in Bezug auf die Anzahl als auch auf die Lokalisation der Monozyten an den Verzweigungen untersucht.

Es stellte sich heraus, dass auch ohne sCD40L-Stimulation bereits eine hohe basale, vermutlich Fluss-induzierte Freisetzung von ULVWF-Multimeren stattfindet und Monozyten an die mit Thrombozyten besetzten ULVWF-Multimere binden. Die basale ULVWF-Multimer-Freisetzung ohne sCD40L-

Stimulation könnte aufgrund des höheren Flusses während des Experiments im Vergleich zur Kultivierungsphase ausgelöst worden sein. Abbildung 24, Seite 86 zeigt, dass nach CD40L-Stimulation kein weiterer signifikanter Anstieg der Gesamtanzahl von freigesetzten ULVWF-Multimeren, der Länge der ULVWF-Multimere und der Anzahl der daran adhärierenden Monozyten festzustellen war.

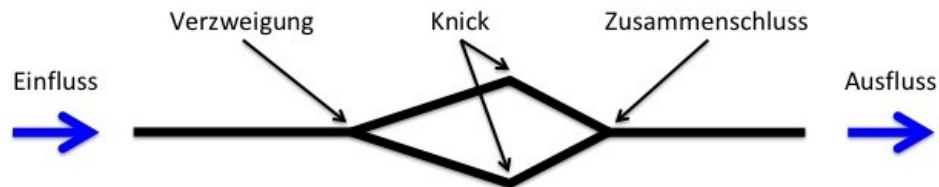


Abbildung 23: Skizze Y-Slide

Das Y-Slide kann in die Abschnitte vor der Verzweigung (zwischen Einfluss und Verzweigung), nach der Verzweigung (zwischen Verzweigung und Knick), nach dem Knick (zwischen Knick und Zusammenschluss) und nach dem Zusammenschluss (zwischen Zusammenschluss und Ausfluss) unterteilt werden. Die Kanäle des Slides haben eine Höhe von 0,4 mm und eine Breite von 3 mm, was einer Wachstumsfläche von ca. 2.8 cm² entspricht. Die Kanäle divergieren in einem Winkel von 30° und konvergieren in einem Winkel von 45°.

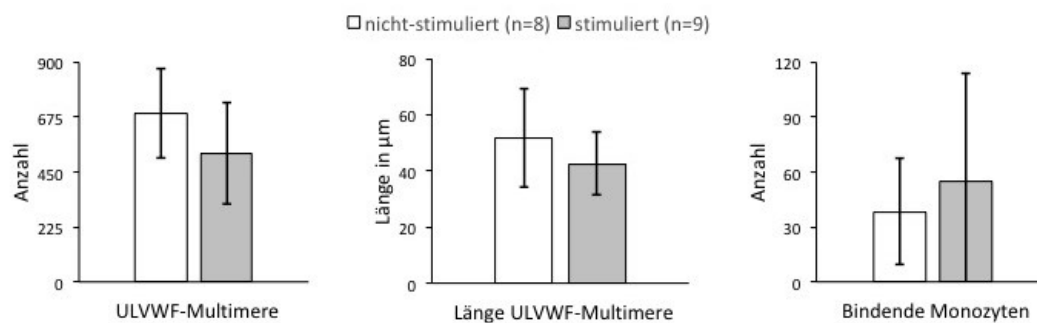


Abbildung 24: ULVWF-Multimer Freisetzung und Adhäsion von Monozyten im Y-Slide

Statistische Auswertung von Aufnahmen der Perfusion von Y-Slides in Bezug auf den Einfluss von sCD40L-Stimulation (0,1 µg/ml) auf die Anzahl freigesetzter ULVWF-Multimere, die durchschnittliche ULVWF-Multimer-Länge und die Anzahl adhärrender Monozyten. In keinem der Fälle konnte ein signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied zwischen Versuchen mit und ohne sCD40L-Stimulation festgestellt werden. Auffallend ist die hohe Anzahl freigesetzter ULVWF-Multimere und adhärrender Monozyten auch in Abwesenheit von sCD40L.

In Bezug auf die Lokalisation der freigesetzten ULVWF-Multimere konnte nach sCD40L-Stimulation ein geringfügiger, aber signifikanter prozentualer Anstieg nach der Verzweigung festgestellt werden (Abbildung 25, Seite 87).

Die Anzahl adhärrender Monozyten nach sCD40L-Stimulation nahm nach den Verzweigungen um ca. 100 % zu. Zusätzlich adhärten nach Stimulation um die Hälfte weniger Monozyten nach dem Knick (Abbildung 26, Seite 87).

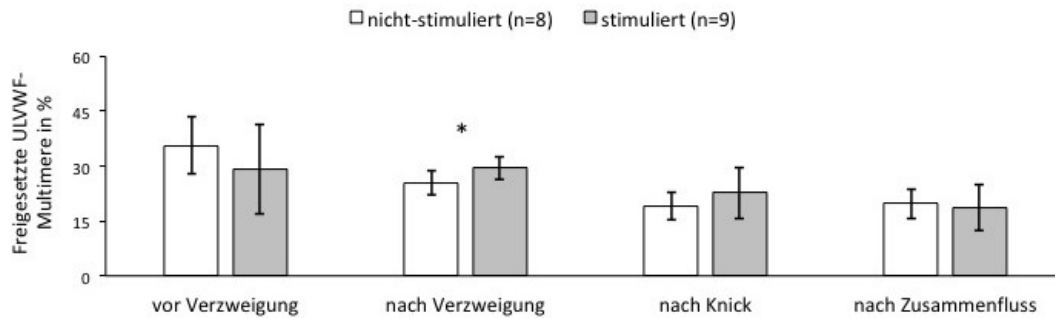


Abbildung 25: Ortsabhängigkeit der Freisetzung von ULVWF-Multimeren im Y-Slide

Statistische Auswertung von Aufnahmen der Perfusion von Y-Slides in Bezug auf Ortsabhängigkeit der Freisetzung von ULVWF-Multimeren. Nach der Verzweigung des Y-Slides konnte im Vergleich zu Kontrollversuchen ohne sCD40L-Stimulation ein signifikanter ($p=0,022$) Anstieg in der Anzahl freigesetzter ULVWF-Multimere nach sCD40L-Stimulation ($0,1 \mu\text{g/ml}$) gemessen werden (* = $p < 0,05$).

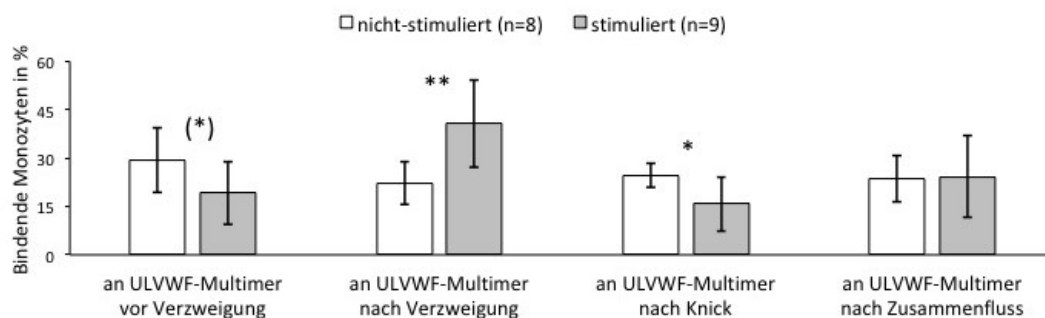


Abbildung 26: Ortsabhängigkeit der Bindung von Monozyten im Y-Slide

Statistische Auswertung von Aufnahmen der Perfusion von Y-Slides in Bezug auf die Ortsabhängigkeit der Adhäsion von Monozyten. Stimulation mit sCD40L ($0,1 \mu\text{g/ml}$) führte nach der Verzweigung des Y-Slides zu einer hochsignifikanten ($p=0,003$) Zunahme an adhärierenden Monozyten. Nach dem Knick adhärten signifikant ($p=0,016$) weniger Monozyten nach sCD40L-Stimulation. Darüber hinaus wurden keine weiteren signifikanten ($p < 0,05$) Unterschiede zwischen Versuchen mit und ohne sCD40L-Stimulation festgestellt (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, (*) = $0,06 > p > 0,05$).

In Bezug auf die Bindungsposition von Monozyten auf den ULVWF-Multimeren konnte eine kleine prozentuale Abnahme der Adhäsion von Monozyten am Ende von ULVWF-Multimeren nach sCD40L-Stimulation festgestellt werden (Abbildung 27, Seite 88). Bei der prozentualen Verteilung von Monozyten am Anfang und in der Mitte von ULVWF-Multimeren sowie direkt an Endothelzellen haftender und rollender Monozyten konnte nach Stimulation keine signifikante Veränderung festgestellt werden.

Insgesamt konnten trotz der hohen basalen Freisetzung von ULVWF-Multimeren und der Adhäsion von Monozyten im Y-Slide Unterschiede zwischen Versuchen mit und ohne sCD40L-Stimulation festgestellt werden. Dabei konzentrierten sich die Effekte vor allem auf den Bereich direkt nach der Verzweigung. Das

Vorhandensein einer Verzweigung mit dadurch einhergehenden Veränderungen der Flussbedingungen begünstigt somit in Verbindung mit sCD40L-Stimulation eine vermehrte Freisetzung von ULVWF-Multimeren aus Endothelzellen und die Adhäsion von Monozyten ans Endothel.

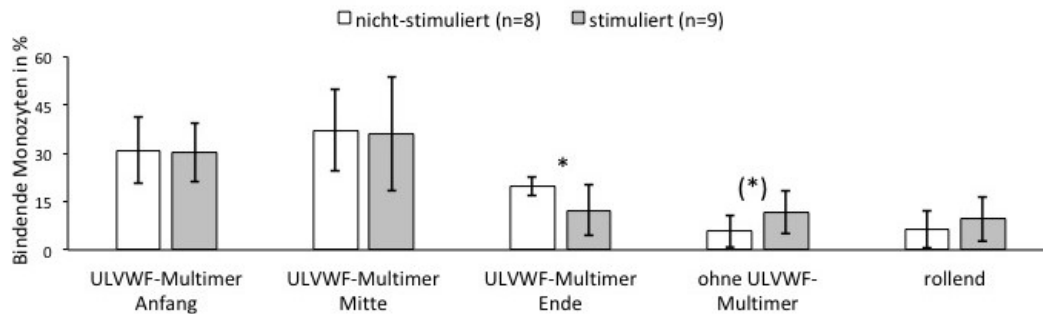


Abbildung 27: Ortsabhängigkeit der Bindung von Monozyten auf ULVWF-Multimeren im Y-Slide

Statistische Auswertung von Aufnahmen der Perfusion von Y-Slides in Bezug auf die Bindungsposition von Monozyten auf den ULVWF-Multimeren. Am Ende von ULVWF-Multimeren binden signifikant ($p=0,024$) weniger Monozyten nach sCD40L-Stimulation ($0,1 \mu\text{g/ml}$) als ohne Stimulation. Darüber hinaus wurden keine weiteren signifikanten ($p < 0,05$) Unterschiede zwischen Versuchen mit und ohne sCD40L-Stimulation festgestellt (* = $p < 0,05$, (*) = $0,06 > p > 0,05$).

4.3. Perfusion der murinen Karotisverzweigung

In dieser Arbeit wurde ein neuartiges *ex vivo*-Perfusionsmodell der murinen Karotisverzweigung etabliert. Bei diesem Ansatz können die Interaktionen von Monozyten mit Thrombozyten und Endothelzellen in Gefäßverzweigungen beobachtet und analysiert werden. Weiterhin sind durch die Verwendung von Gefäßen verschiedener Knockout-Mäuse und Inhibitoren bzw. Stimulantien mechanistische Untersuchungen der initialen Monozytenadhäsion und Transmigration möglich.

In den folgenden Kapiteln sind die Resultate der einzelnen Etablierungsschritte des Perfusionsmodells der Gefäßverzweigung beschrieben. Danach folgen die mit diesem Perfusionsmodell erzeugten Ergebnisse.

4.3.1. Präparation Karotisverzweigung

Bei der Präparation der Karotidenverzweigung zeigte sich, dass gewisse Gefäßabschnitte und Verzweigungen eine konstante Position und Anzahl aufweisen, andere hingegen sehr variabel sind (Abbildung 28, Seite 89). Die Hauptgefäße *Aorta carotis communis*, *interna* und *externa* blieben immer

unverändert. Kleinere Abzweigungen waren jedoch in Anzahl und auch Position variabel, insbesondere bei den verschiedenen Mauslinien, aber auch bei genetisch identischen Tieren innerhalb einer Mauslinie. Es waren immer mindestens zwei variable Gefäße vorhanden, manchmal jedoch auch bis zu vier. Da die kleineren Abzweigungen abgebunden wurden, um ein Ausfließen des Perfusionsmediums zu verhindern, hatten sie keinen direkten Einfluss auf die Perfusion selbst. Ihre Position konnte jedoch dazu führen, dass sie später bei Aufnahmen des Gefäßes dieses überdeckten und so die Auswertung erschwerten. Darüber hinaus stellten die Reste der abgebundenen Abzweigungen Nischen dar, in denen kein Fluss herrschte. Hier konnten sich Monozyten auch ohne ULVWF-Multimer-Interaktionen an die Endothelzellen anlagern. Aus diesem Grund wurden bei den Auswertungen die Monozyten in den abgebundenen Abgängen nicht berücksichtigt.

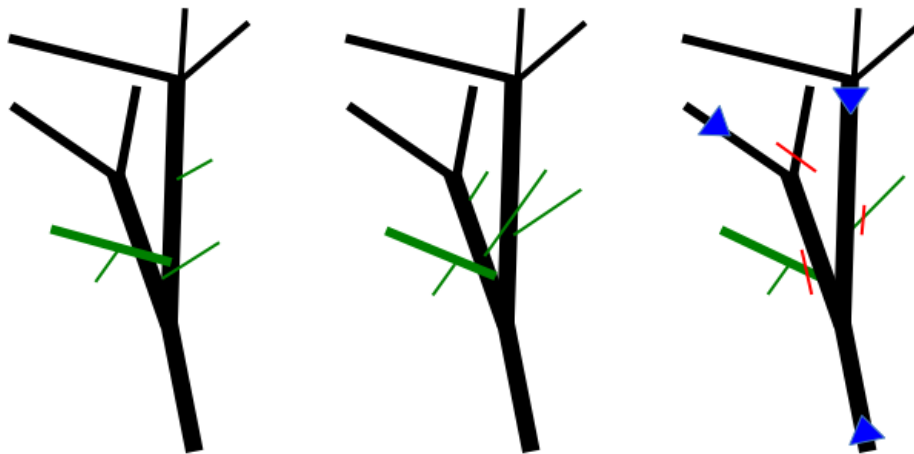


Abbildung 28: Skizze der Karotisverzweigung

Die hier abgebildete rechte *Arteria carotis communis* verzweigt sich von distal nach proximal (blauer Pfeil rechts unten) nach links in die *Arteria carotis interna* (versorgt den vorderen Teil des Gehirns sowie das Auge und seine Anhänge) und nach rechts in die *Arteria carotis externa* (versorgt den größten Teil der Kopf- und Halsweichteile, sowie Teile des knöchernen Schädels und der *Dura mater* mit arteriellem Blut). In schwarz sind die Gefäße abgebildet, die in ihrer Form und Lokalität konstant sind. In grün sind die Gefäße abgebildet, die sowohl in Anzahl als auch Position stark variieren. Die am häufigsten angetroffene Anordnung der Gefäße ist in der rechten Darstellung zu sehen. Blaue Dreiecke markieren die Stellen, an denen die Kapillaren nach Durchtrennung des Gefäßes eingeführt wurden. Rote Striche stellen die Ligaturen dar.

4.3.2. CD31-, vWF-, Thrombozyten- und Monozytenfärbung im Gefäß

Die Intaktheit der Endothelzellschicht in der Karotisverzweigung nach erfolgter Perfusion wurde durch eine Endothelzellfärbung mittels Anti-CD31-Antikörper nachgewiesen (Kapitel 3.8.3, Seite 70). Eine zusätzliche Färbung mittels Anti-vWF-Antikörper bestätigte, dass die Endothelzellen auf sCD40L-Stimulation mit einer vWF-Freisetzung reagieren (Abbildung 29, Seite 90).

Die nach der Isolation durchgeführte Thrombozyten- (Kapitel 3.2.4, Seite 47) und Monozyten-Färbung (Kapitel 3.2.5, Seite 48) mit Calcein Green und CellTracker Red konnte mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie erfolgreich dokumentiert werden. Nach der Perfusion waren die rot gefärbten Monozyten im Gefäß deutlich sichtbar (siehe Abbildung 31, Seite 92). Die grün gefärbten Thrombozyten hingegen waren aufgrund ihrer geringen Größe und der hohen Eigenfluoreszenz des Gefäßes im Grünkanal nicht darstellbar. Der Visualisierung der Monozyten wurde höhere Priorität als der der Thrombozyten beigemessen, weshalb deren Farbstoffe nicht getauscht wurden. Weil die mit Thrombozyten und Monozyten dekorierten ULVWF-Multimere durch Antikörperfärbung visualisierbar waren, wurden Thrombozyten in den folgenden Perfusionsansätzen nicht mehr angefärbt.

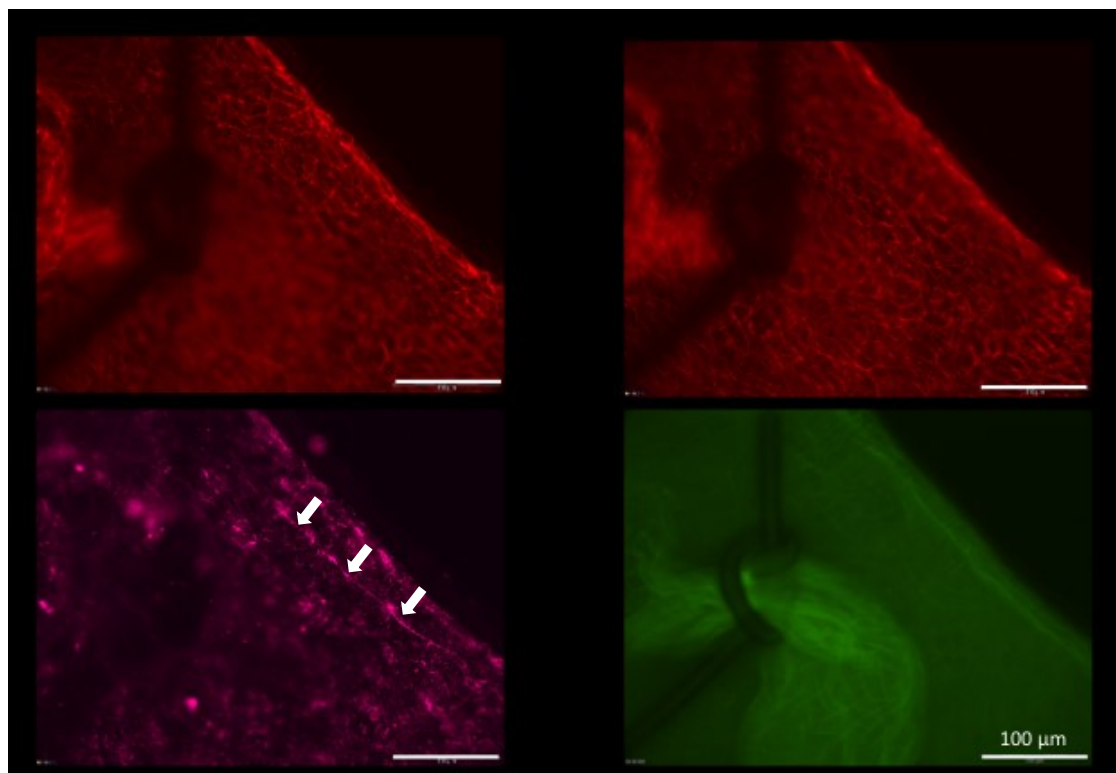


Abbildung 29: CD31- und vWF-Färbung der Arteria carotis

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Abschnitts der *Arteria carotis interna*. Oben links und rechts: Endothelzellen wurden mit Anti-CD31-Antikörper (rot) angefärbt und zeigen ihr typisches Kopfsteinpflastermuster. Aufgrund der dreidimensionalen Ausdehnung des Gefäßes sind zwei Aufnahmen bei unterschiedlicher z-Höhe abgebildet. Unten links: von-Willebrand-Faktor (vWF) (magenta) bildet unter Flussbedingungen nach sCD40L-Stimulation stellenweise die typischen ULVWF-Multimere (weiße Pfeile). Unten rechts: Die Eigenfluoreszenz (grün) des Gefäßes im Grünkanal des Fluoreszenzmikroskops hebt besonders deutlich Gefäßumrisse, wie die hier vorhandene abgebundene Gefäßverzweigung, hervor. Die Messbalken entsprechen in allen Aufnahmen 100 μm .

4.3.3. Lokalisation der ULVWF-Multimere in der Gefäßverzweigung

Nach dem erfolgreichen Nachweis von ULVWF-Multimeren im Gefäß stellte sich die Frage, ob diese, wie im ibidi Y-Slide (Kapitel 4.2.3, Seite 85), eine besondere Verteilung im Gefäß haben und ob sCD40L-Stimulation der Endothelzellen darauf einen Einfluss hat. In nicht-stimulierten Gefäßen konnte im Gefäßpräparat keine Bildung von ULVWF-Multimeren beobachtet werden. In stimulierten Gefäßen waren ULVWF-Multimere nachweisbar und zeigten eine positionsabhängige Verteilung im perfundierten Gefäß. Es bildeten sich über das gesamte Gefäß verteilt einzelne Multimere, jedoch mit einer signifikanten Zunahme direkt in und nach der Verzweigung (Abbildung 30, Seite 91). Das Strömungsprofil der Karotisverzweigung (Abbildung 37, Seite 97) führt somit nach Stimulation zu einer vermehrten Freisetzung und Auflagerung von ULVWF-Multimeren in der Verzweigung, von wo aus die ULVWF-Multimere bis in den Bereich nach der Verzweigung reichen. Das Ausbreitungsmuster der ULVWF-Multimere deckt sich somit mit demjenigen der atherosklerotischen Plaques, die in Biegungen und direkt nach Gefäßverzweigungen auftreten.

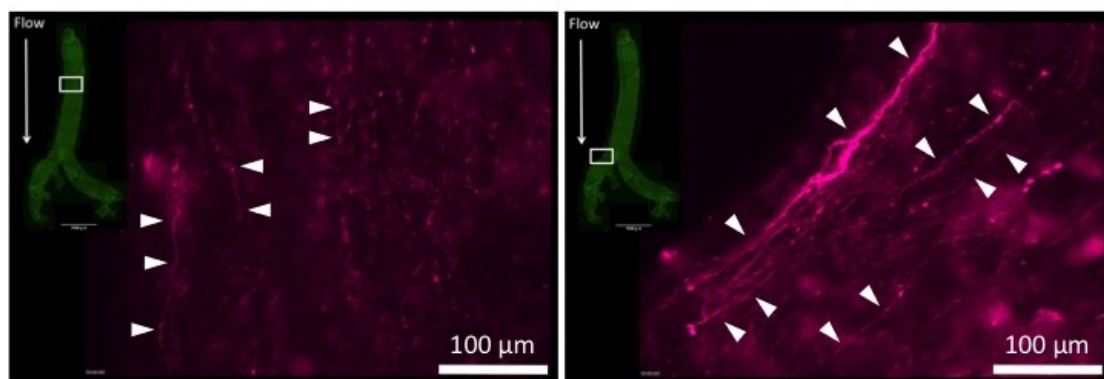


Abbildung 30: Lokalisation ULVWF-Multimere in der Karotisverzweigung

Fluoreszenzaufnahmen der vWF-Färbung (magenta) nach sCD40L-Stimulation (0,1 µg/ml), die Übersichtsaufnahme zeigt die grüne Autofluoreszenz. Das linke Bild zeigt einen Gefäßausschnitt weit vor der Verzweigung mit wenigen ULVWF-Multimeren. Das rechte Bild zeigt einen Gefäßausschnitt direkt in und nach der Verzweigung mit vielen ULVWF-Multimeren. Einige ULVWF-Multimere sind exemplarisch mit weißen Pfeilen markiert.

4.3.4. Darstellung der Monozytenadhäsion nach Perfusion

Position und Anzahl der adhärenenden Monozyten aus den Mikroskopaufnahmen wurden in eine standardisierte Gefäßskizze übertragen (Abbildung 31, Seite 92). Um Einflüsse durch Gefäßverletzungen an den Einführungs- und Befestigungsstellen der Kapillaren in und an das Gefäß auszuschließen, wurde nur ein definierter, von den Gefäßverletzungen entfernter Messbereich analysiert. Der Messbereich umfasste zusätzlich auch

keine abgebundenen Verzweigungen, da in diesen aufgrund des darin ausbleibenden Flusses Monozyten ohne spezifische Endothelinteraktionen hängen bleiben konnten. Sichtbare Artefakte, wie z.B. adhärierende Monozyten in Gefäßfalten, die aufgrund von Verdrehung des Gefäßes entstanden waren, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

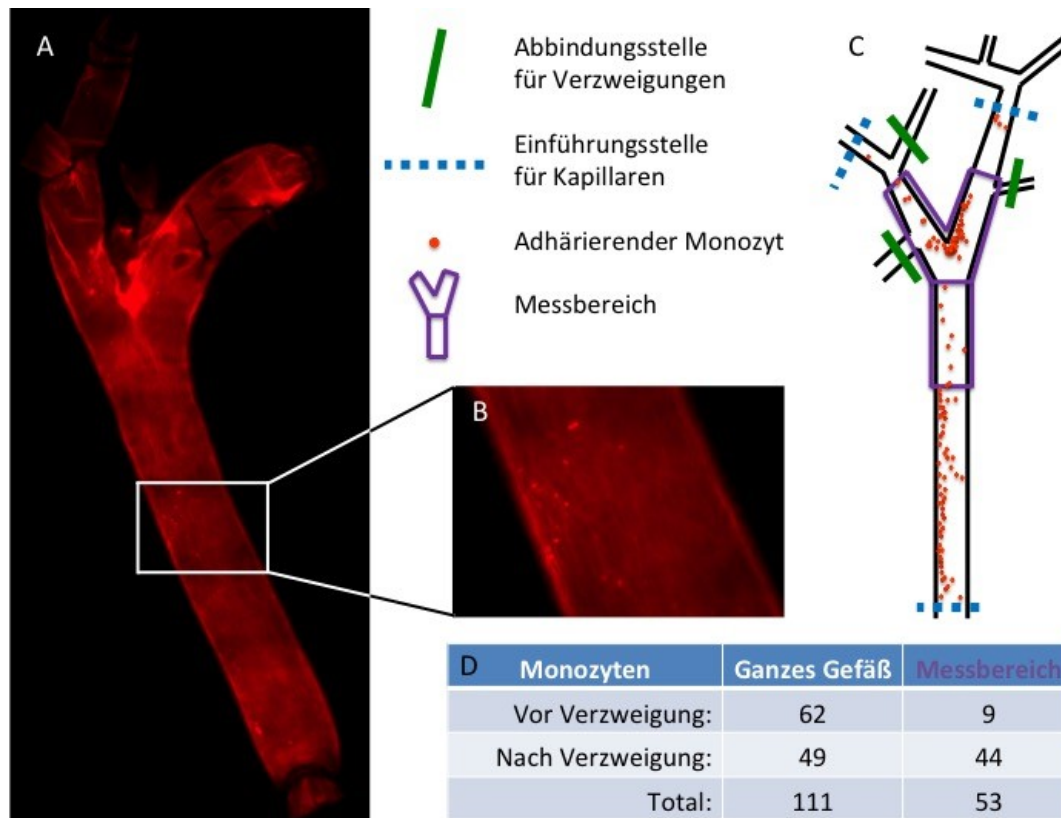


Abbildung 31: Auswertung Monozytenperfusion

(A) Übersicht der Karotisverzweigung mit darin adhärierenden CellTracker Red gefärbten Monozyten nach Perfusion. (B) Vergrößerter Ausschnitt der Fluoreszenzaufnahmen. (C) In eine Skizze des Gefäßes übertragene Lokalisation der Monozyten. (D) Exemplarische Auszählung der Bindungspositionen der Monozyten im gesamten Gefäß und im Messbereich zur statistischen Auswertung.

4.3.5. Berechnung von Fluss und Schubspannung im *ex vivo*-Perfusionssystem

Die Bedingungen bezüglich Schubspannung im *ex vivo*-Perfusionssystem der Gefäßverzweigung sollten mit denen in Gefäßen *in vivo* verglichen werden. Dazu wurde unter anderem der Volumenfluss benötigt. Die Berechnung der entsprechenden Rate erfolgte durch Bestimmung des perfundierten Flüssigkeitsvolumens pro Versuchszeit nach dem Perfusionsexperiment. Je nach Experiment schwankte der so bestimmte Fluss zwischen 300 und 700 $\mu\text{l}/\text{min}$. Aus dem jeweiligen Volumenfluss, der Viskosität der Lösung und dem Radius des Gefäßes wurde die aufgetretene Schubspannung im Gefäß ermittelt (Kapitel 3.8.6, Seite 72). Da aufgrund des Flachdrückens des Gefäßes für eine scharfe

Darstellung beim Mikroskopieren der Radius des Gefäßes nicht eindeutig bestimmt werden konnte, wurde jeweils sowohl der kleinstmögliche als auch der größtmögliche Radiuswert für die Schubspannungsberechnung verwendet. Die resultierende Spanne an Schubspannungswerten ergab sich in Abhängigkeit des Volumenflusses. Wie aus der Abbildung 32, Seite 93 ersichtlich ist, hatte der Radius des Gefäßes einen viel größeren Einfluss auf die Schubspannung als der Fluss. In der Auswertung wurden nur Versuche mit vergleichbarem Fluss von 600 bis 700 $\mu\text{l}/\text{min}$ berücksichtigt. Bei diesen Gefäßen lag der Radiuswert am unteren Ende der möglichen Radiusspanne, somit wurde eine Schubspannung von mindestens 20-30 dyn/cm^2 erreicht.

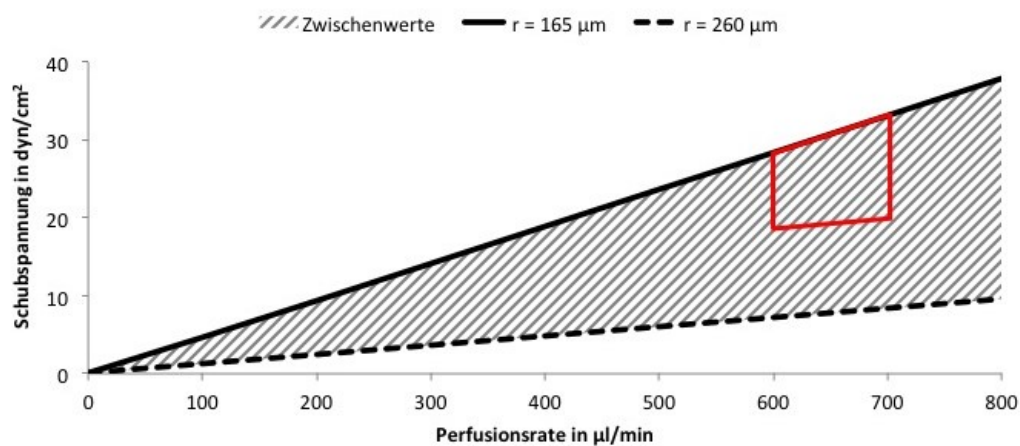


Abbildung 32: Abhängigkeit der Schubspannung von Volumenfluss und Gefäßdurchmesser

Aufgrund der Variation bei der Bestimmung des Gefäßdurchmessers wird der Gefäßradius als Spanne vom größten bis zum kleinsten möglichen Wert angegeben. Für die Spanne des Radius wird in Verbindung mit der Viskosität des Perfusionsmediums (0,001 Pa·s) die Schubspannung für verschiedene Volumenflüsse im Gefäß berechnet. Bei einer Radiusspanne von 260 bis 165 μm unterscheidet sich der Schubspannungswert um annähernd den Faktor 4 bei gleichem Fluss. In rot ist der Bereich eingezeichnet, in dem sich die Werte für Schubspannung, Fluss und Gefäßradius für die zur Auswertung verwendeten Versuche bewegten.

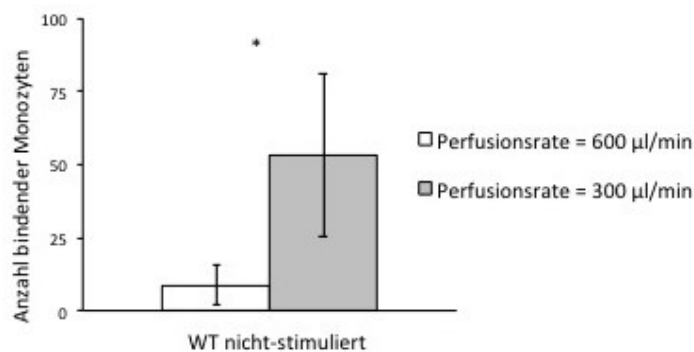


Abbildung 33: Vergleich der Monozytenadhäsion bei normaler und niedriger Perfusionsrate

Bei der Perfusion von Gefäßverzweigungen ergaben sich abhängig vom eingestellten Perfusionsdruck und von Gefäßdurchmesser unterschiedliche Perfusionsraten. Bei niedrigen Perfusionsraten von ca. 300 $\mu\text{l}/\text{min}$ ($n=3$) adhärten signifikant ($p=0,025$) mehr Monozyten ($+ 44,58 \pm 14,54$ Monozyten) als bei den üblichen Perfusionsraten von ca. 600 $\mu\text{l}/\text{min}$ ($n=4$) in nicht-stimulierten Gefäßen von WT-Mäusen (* = $p < 0,05$).

Bei geringen Perfusionsraten um 300 $\mu\text{l}/\text{min}$, und daraus folgenden geringen Schubspannungen von weniger als 10 dyn/cm^2 , wurde etwa eine Verzehnfachung der Monozytenbindung ohne sCD40L-Stimulation im Gefäß beobachtet (Abbildung 33, Seite 93). Da diese Flussbedingungen sich deutlich von natürlichen Werten unterschieden, wurde angenommen, dass es sich bei diesen Monozytenbindungen nicht um Thrombozyten-ULVWF-Multimer vermittelte Interaktionen, sondern davon unabhängige Adhäsionen handelte. Somit wurden Ergebnisse von Versuchen mit niedrigem Volumenfluss bei der Auswertung ausgeschlossen.

4.3.6. Verteilung von adhärenenten Monozyten in Gefäßverzweigungen

Gefäße von Mäusen verschiedener Knockout-Linien wurden mit sCD40L stimuliert und mit aus der jeweiligen KO-Linie isolierten Thrombozyten und Monozyten perfundiert. Ziel war es zu untersuchen, ob sCD40L-Stimulation die Monozytenadhäsion erhöht und ob dabei Unterschiede zwischen den verschiedenen KO-Mausmodellen auftreten. Die Resultate der Gefäßperfusionen wurden in Bindungspositions-Skizzen mit definiertem Messbereich graphisch zusammengefasst (Abbildung 34, Seite 95). Die Quantifizierung von adhärierenden Monozyten in dem Messbereich erfolgte durch Auszählen direkt vor und nach den Verzweigungen.

Die statistische Auswertung bezüglich der Anzahl adhärrender Monozyten ergab, dass bei WT, vWF-KO und CD40-KO Mäusen keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuchen mit und ohne sCD40L-Stimulation auftraten. Bei ApoE-KO Mäusen konnte nach sCD40L-Stimulation eine ca. 10-fach erhöhte Monozytenadhäsion gegenüber Versuchen ohne Stimulation festgestellt werden, die statistisch hoch signifikant war. Auch gegenüber den Versuchen von WT, vWF-KO und CD40-KO mit Stimulation wurde eine ca. 4,5-fach erhöhte Monozytenadhäsion festgestellt, die statistisch sehr bis hoch signifikant war (Abbildung 35, Seite 95).

Bei der statistischen Auswertung bezüglich der Bindungsposition der adhärierenden Monozyten zeigte sich, dass sowohl mit als auch ohne CD40L-Stimulation in den Gefäßen aller KO-Mausmodelle, außer bei nicht-stimulierten ApoE-KO Tieren, die Monozyten signifikant zu mehr als 75 % nach der Verzweigung anhaften (Abbildung 36, Seite 96). Dabei konnte jedoch weder die Außen- noch Innenseite der Tochtergefäße *Arteria carotis interna* und *externa* als bevorzugte Bindungsposition der Monozyten identifiziert werden.

Somit hatte die sCD40L-Stimulation keinen signifikanten Einfluss auf die Bindungsposition der Monozyten im Gefäß nach der Bifurkation, nur in ApoE-KO Tieren adhärten signifikant mehr Monozyten an diesen Stellen.

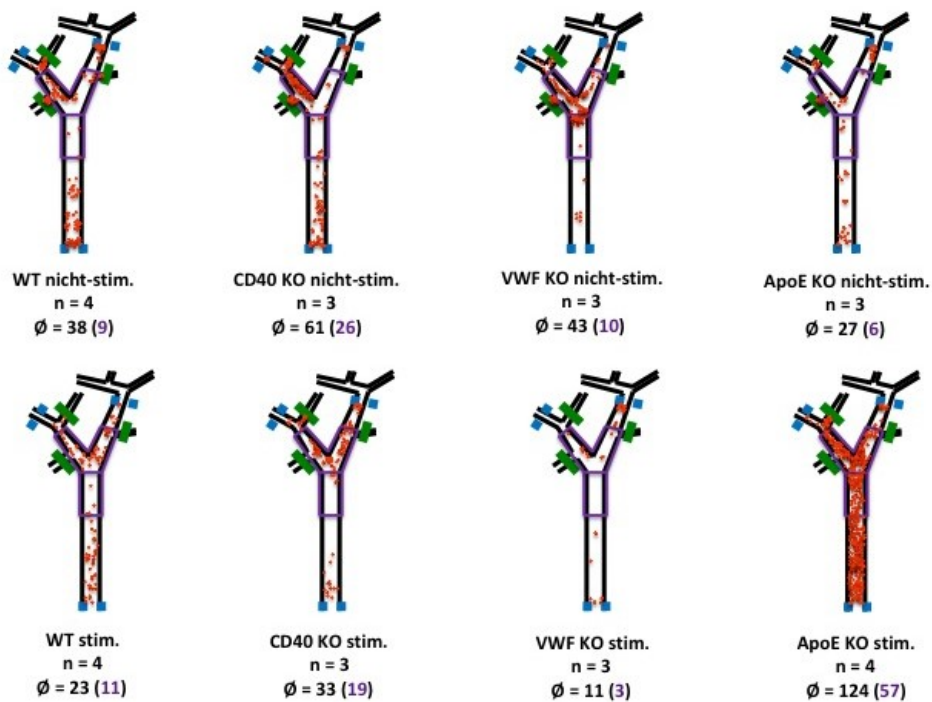


Abbildung 34: Bindungspositionen-Skizzen der Monozyten in Gefäßbifurkationen von verschiedenen KO-Mauslinien

Die Bindungspositionen von Monozyten im Gefäß wurden jeweils in einer Gefäßskizze eingetragen und die Experimente mit gleichen Genotypen und gleichem Stimulationszustand übereinander gelegt. Der violette Rahmen kennzeichnet den für die statistischen Auswertungen verwendeten Bereich. Angegeben sind die durchschnittliche Anzahl bindender Monozyten im gesamten Gefäß und in Klammern dahinter im violett markierten Messbereich.

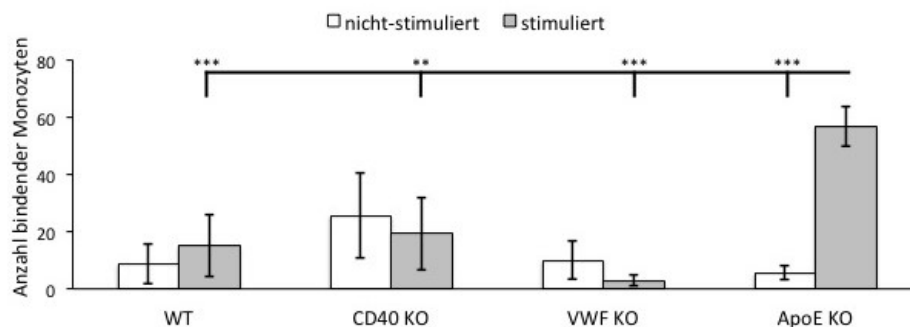


Abbildung 35: Monozytenadhäsion in verschiedenen Knockout-Mausmodellen

Die Monozytenadhäsion im Bifurkations-Messbereich von verschiedenen KO-Mauslinien wurde mit (n=3) und ohne (n=3) sCD40L-Stimulation (0,1 µg/ml) untersucht. Nach Stimulation adhärten hoch-signifikant mehr Monozyten in den Gefäßen von ApoE-KO Tieren als ohne Stimulation. Auch im Vergleich mit Gefäßen von anderen KO-Mauslinien adhärten in Gefäßen von ApoE-KO Tieren sehr bis hoch signifikant mehr Monozyten nach Stimulation. Bei den restlichen KO-Mauslinien konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Experimenten mit und ohne sCD40L-Stimulation desselben sowie verschiedener Genotypen festgestellt werden (** = p < 0,01, *** = p < 0,001).

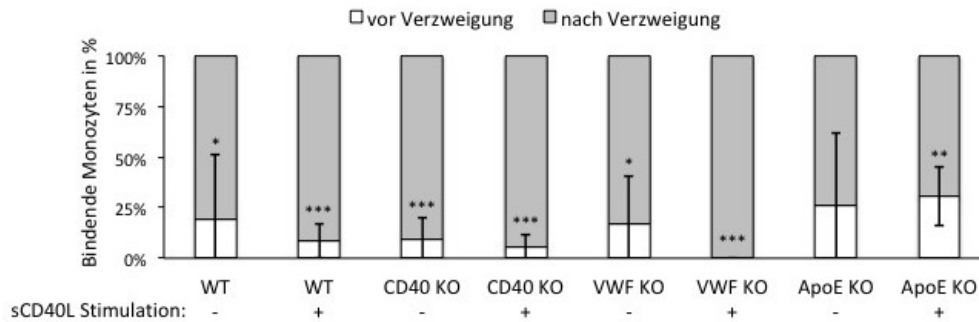


Abbildung 36: Verteilung der Monozytenadhäsion im Gefäßverzweigungssystem

Dieselben Resultate wie in Abbildung 35, Seite 95 wurden bezüglich der Bindungsposition der Monozyten in der Gefäßverzweigung dargestellt. In fast allen Fällen adhären Monozyten ungeachtet des Genotyps der Maus und der Zugabe von Stimulans bevorzugt nach der Verzweigung. Zwischen den verschiedenen Genotypen und auch zwischen Tieren mit und ohne sCD40L-Stimulation konnte wegen der Streubreite diesbezüglich kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($n = 3-4$; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

4.3.7. Flussvisualisierung in der Gefäßverzweigung

Mathematische Modelle des Flusses an Gefäßverzweigungen zeigen eine Verwirbelung mit lokaler Flussumkehrung direkt nach Verzweigungen (Tezduyar *et al.*, 2007). Zur Demonstration, dass im etablierten Perfusionsystem der Karotisverzweigung auch solche Flussprofile nachweisbar sind, wurde ein mit Blut perfundiertes Gefäß mit dem PeriCamPSI High Resolution System aufgenommen (Kapitel 3.8.8, Seite 74). Das Gerät misst die Geschwindigkeit des Blutstroms anhand der Bewegung von Erythrozyten und gibt sie in arbiträren Einheiten (PU) an. Die Flussgeschwindigkeiten wurden mit den Farben blau (kein Fluss), grün (langsamer Fluss), gelb (normaler Fluss) und rot (schneller Fluss) dargestellt (Abbildung 37-A, Seite 97). Mit diesem System können durch Verwirbelungen verursachte Geschwindigkeitsänderungen, nicht aber die Flussrichtung dargestellt werden. Entsprechend den mathematischen Modellen wurde im Gefäß ein laminarer Fluss vor der Verzweigung und ein nicht-laminare Flussprofil in und kurz nach der Verzweigung erwartet.

Die PSI-Aufnahmen (Abbildung 37-A, Seite 97) zeigen im Bereich vor der Verzweigung eine annähernd gleichmäßige normale bis hohe Fließgeschwindigkeit (gelb-rot). In und nach der Verzweigung gibt es Perfusions-spitzenwerte (rot) in der Mitte der Gefäße. Die Randbereiche der Tochtergefäße weisen einen reduzierten Fluss (grün) auf. Diese beobachteten Flussprofile entsprechen teilweise den mathematischen Modellen (Abbildung 37-B linkes Gefäß, Seite 97). Die Flussumkehrung im mathematischen Modell (Abbildung 37-B rechtes Gefäß, Seite 97) kann beim *ex vivo*-Perfusionsmodell aufgrund des nicht-pulsatilen Flusses nicht auftreten. Somit entspricht das beobachtete Flussprofil des *ex vivo*-Perfusionsmodells weitestgehend den Erwartungen aus

den mathematischen Modellen und kann als gute Repräsentation des echten Blutflusses betrachtet werden.

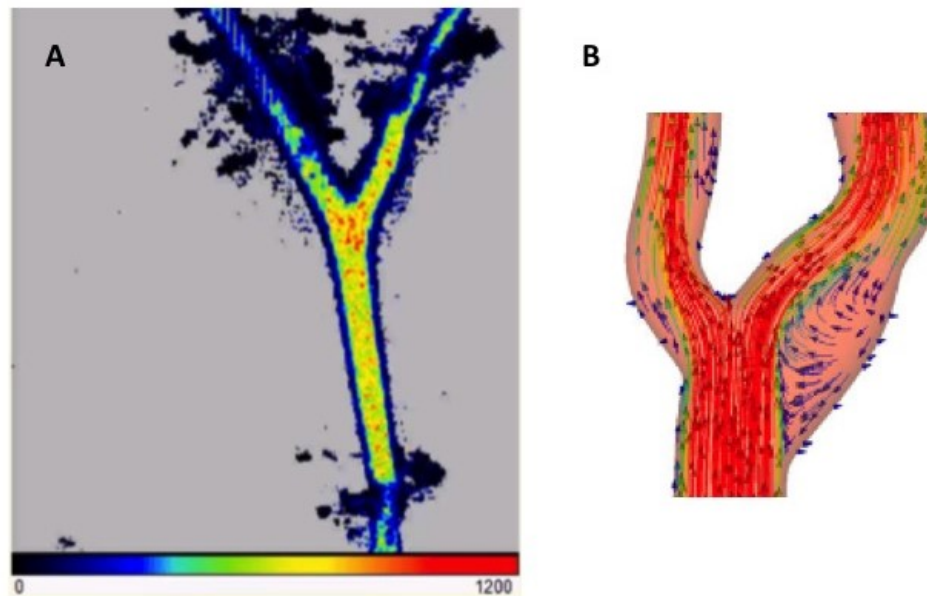


Abbildung 37: Flussdarstellung in der Gefäßverzweigung mithilfe des PeriCam PSI Systems

(A) Exemplarische Aufnahme der Perfusion der Karotisverzweigung mithilfe des PeriCam LSCI-Systems ($n = 1$). Die PeriCam zeichnete die Bewegung der Erythrozyten mit 40 Bildern pro Sekunde auf und gibt ihre relative Geschwindigkeit von langsam (in blau) bis schnell (in rot) an. In dieser Aufnahme wurden fünf Bilder gemittelt, das Bild zeigt also die Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit während 125 ms an. In der Gefäßverzweigung ist das Flussprofil nicht-laminar. (B) Computer generiertes Flussprofil in der Karotisverzweigung (Tezduyar *et al.*, 2007). Verschiedene Strömungsgeschwindigkeiten mit lokaler Flussumkehrung treten auf.

5. Diskussion

In den folgenden Kapiteln werden die Resultate aus den drei Projektteilen ApoE-KO Mauslinie mit induzierbarem endotheliale CD40-KO (Kapitel 4.1, Seite 75), Y-Slide Perfusion (Kapitel 4.2, Seite 83) und Karotisverzweigung Perfusion (Kapitel 4.3, Seite 88) diskutiert. Die Induzierbarkeit des endothelialen CD40-KO konnte leider nicht verifiziert werden. Daher wurden die geplanten Untersuchungen mit diesen Tieren nicht durchgeführt. Alle damit in Verbindung stehenden Etablierungsarbeiten wurden jedoch erfolgreich abgeschlossen und stehen bei einer Wiederaufnahme dieses Projektteils zur Verfügung. Bei der Perfusion von humanen Endothelzellen mit Thrombozyten und Monozyten in Y-Slides konnte im Bereich der Verzweigung nach sCD40L-Stimulation ein signifikanter Anstieg der Anzahl freigesetzter ULVWF-Multimere und adhärierender Monozyten festgestellt werden. Das neuartige *ex vivo*-Perfusionsmodell einer Karotisverzweigung wurde erfolgreich etabliert und charakterisiert. Auch in diesem Gefäßperfusionsmodell konnte eine gesteigerte Monozytenadhäsion in Gefäßen aus ApoE-KO Mäusen im Vergleich zu WT, CD40-KO und vWF-KO Mäusen nach sCD40L-Stimulation nachgewiesen werden.

5.1. Induzierbare endotheliale CD40-Depletion in der ApoE-KO Maus

5.1.1. Nachweis der endothelialen CD40-Depletion

Zur Untersuchung des Einflusses von endotheliale CD40 auf die Rekrutierung von Monozyten an Atherosklerose-Prädilektionsstellen ist ein Mausmodell mit spezifischer Depletion von CD40 in Endothelzellen notwendig. Globale CD40-KO Mauslinien sind käuflich erhältlich, weisen jedoch beeinträchtigte Immunglobulin-Klassenwechsel und Keimzentrumsbildung in Milz und Lymphknoten auf (Kawabe *et al.*, 1994). Zusätzlich kommt CD40 auch auf Immunzellen wie B-Zellen, Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen, sowie auch neben Endothelzellen auf Epithelzellen, SMCs, Keratinozyten, Fibroblasten und Thrombozyten vor (Chatzigeorgiou *et al.*, 2009). Deshalb wurde ein Mausmodell generiert, bei dem für die Rekombination des CD40-Gens die benötigte Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Tie2-Promoters steht. Dieser wird zwar allgemein als Endothel-spezifisch betrachtet, wird jedoch auch unter anderem in Fibroblasten, Keratinocyten, SMCs und Monozyten exprimiert (Makinde und Agrawal, 2008). Die endotheliale CD40-Depletion wurde mittels Tamoxifen-Verabreichung bei Mäusen im Alter von 10 Wochen induziert, um Komplikationen mit der Ausprägung des spezifischen Immunsystems zu umgehen. Eine Kreuzung dieser Mauslinie mit dem klassischen Atherosklerosemodell der ApoE-KO Maus hätte das Mausmodell des induzierbaren endothelialen CD40-KO für die Atheroskleroseforschung vervollständigt. Die

Induzierbarkeit des endothelialen CD40-KO ließ sich jedoch mit verschiedenen Methoden nicht verifizieren.

Nach Tamoxifenverabreichung sollte das CD40-Gen durch die Rekombinase so geschnitten werden, dass ein verkürztes Transkript entsteht (Abbildung 13, Seite 75), das wegen Unvollständigkeit sofort abgebaut wird. Für diesen Ansatz wurden Endothelzellen aus der Lunge von mit Tamoxifen behandelten Mäusen isoliert und mit Zellen aus Miglyol-Kontrolltieren verglichen. Es wurden pulmonale Endothelzellen verwendet, weil die Cre-Rekombinase in Verbindung mit dem endothelialen Tie2-Promotor in Kapillaren und Arteriolen aktiver ist als in größeren Gefäßen wie der Aorta (Claxton *et al.*, 2008). Die PCR von zu cDNA umgeschriebener mRNA aus pulmonalen Endothelzellen zeigte nicht die erwartete Veränderung im Bandenmuster (Abbildung 14, Seite 76). Die Gensequenz wurde durch die Rekombinase offenbar nicht verändert.

Für den Nichterfolg der Rekombination gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten: Es ist bekannt, dass die Tamoxifen induzierte Cre-Rekombinase je nach Gewebe nur ca. 10 % (Lunge) bis ca. 50 % (Haut) der mit loxP-Stellen markierten Genabschnitte ausschneidet (Feil *et al.*, 1996). Sowohl bei systemischer als auch bei nur auf die *Arteria carotis communis* beschränkter Verabreichung von Tamoxifen tritt die Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination in der *Arteria carotis communis* sogar nur bei 2,1 - 2,4 % der anvisierten Genabschnitte auf (Zadelaar *et al.*, 2006). Die Effizienz der Rekombination ist in Jungtieren höher als in adulten Tieren (Claxton *et al.*, 2008). Die in dieser Arbeit verwendete Tiere können mit einem Alter von 10 Wochen beim Start der Tamoxifeninjektionen als adult angesehen werden. Auch sinkt mit zunehmender genetischer Distanz der loxP-Stellen die Effizienz der Rekombination (Zheng *et al.*, 2000). Es gibt sogar Fälle, in denen auf DNA-Ebene zwar die erfolgte Rekombination, aber mittels Western Blot kein Proteinverlust nachgewiesen werden konnte. Dieses Ereignis ist auf eine episomale Expression des ausgeschnittenen Gens zurückzuführen (Turlo *et al.*, 2010). Episome sind zirkuläre extrachromosomale DNA-Moleküle, die im Zellkern unabhängig von der chromosomalen DNA replizieren (Van Craenenbroeck *et al.*, 2000). Wird eine durch die Cre-Rekombinase ausgeschnittene Gensequenz nicht degradiert, kann sie als Episom weiterbestehen. Bei allen möglichen Faktoren, die die Effizienz der Rekombination beeinflussen, wie verwendetes Gewebe, Alter der Mäuse, genetische Distanz der loxP-Stellen sowieso episomale Expression, war in der entsprechenden Literatur mittels PCR immer eine Größenverschiebung der Banden entsprechend der Genverkürzung nachweisbar.

Es muss somit in Betracht gezogen werden, dass das Problem entweder bei der Verabreichung des Tamoxifens, der Tie2 regulierten Expression der Cre-Rekombinase, der Tamoxifen induzierten nukleären Translokation der ERT2-modifizierten Cre-Rekombinase oder den loxP-Stellen lag.

Da die Tamoxifeninjektionen am IBF von geschultem Personal durchgeführt wurden und in anderen Fällen erfolgreich waren, wurde dies als mögliche Fehlerquelle ausgeschlossen. Die restlichen Fehlerquellen hätten intensive Sequenzierungen und Kontrollexperimente erfordert, um die Ursache zu identifizieren. Daher wurde darauf verzichtet, die Generierung der induzierbaren endothelialen CD40-KO Maus als fehlgeschlagen betrachtet und eingestellt. Die geplanten Methoden wie Plaquevisualisierung, Arteriogenesedarstellung, etc. wurden allerdings erfolgreich etabliert (Kapitel 4.1.2, Seite 77 bis Kapitel 4.1.8, Seite 82) und werden in den folgenden Kapiteln diskutiert.

5.1.2. Plaquedarstellung mithilfe von Ultraschall und Oil Red O-Färbung

Die Ultraschallbildgebung ermöglicht eine kontinuierliche und nicht-invasive Beobachtung und sollte daher in dieser Studie zur Dokumentation der Plaqueentwicklung eingesetzt werden. Es hat sich gezeigt, dass nur fortgeschrittene Plaques deutlich identifiziert werden konnten, wie ein nachträglicher optischer Vergleich mit dem Gewebe nach finaler Entnahme zeigte (Abbildung 16, Seite 78). Nebst kleinen Plaques konnte auch das Frühstadium der Plaques, die „fatty streaks“, nicht dargestellt werden. Damit ist die Darstellung von Plaques in der Frühphase der Atherosklerose mit dieser Methode nicht möglich. Die Hüllen von mit Kontrastmittel gefüllten Mikrobäschen können mit Liganden konjugiert werden, die die Bäschen an ein spezifisches Ziel, wie z.B. VCAM-1 oder P-Selektin, binden lassen (Lindner, 2004). Der Einsatz dieser Bäschen wurde jedoch nicht realisiert. Derartige Bäschen wurden bereits erfolgreich eingesetzt, um murine vaskuläre Entzündungen nicht nur in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques, sondern auch an Läsionen in der Frühphase der Atherosklerose, zu detektieren (Kaufmann *et al.*, 2010).

Als Alternative zur Ultraschall-gestützten Plaquevisualisierung wurde die ORO-Färbung der Aorta nach Tötung der Tiere etabliert. Diese Färbung hat den Vorteil, dass auch in der Frühphase der Atherosklerose die Fettstreifen als Vorläufer der sich bildenden Plaques angefärbt werden können (Abbildung 17, Seite 79). Die ORO-Färbung ist wegen ihrer Simplität und Aussagekraft deshalb ein gebräuchliches Mittel zur Bestimmung der Plaquebelastung (Andrés-Manzano *et al.*, 2015).

5.1.3. Darstellung der CD40-Expression an Gefäßverzweigungen

In einem weiteren Artherosklerose-Mausmodell, der LDL-Rezeptor-KO-Maus, konnte in der eigenen Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass die endotheliale CD40-Expression an Prädilektionsstellen für Atherosklerose erhöht ist (Korff *et al.*, 2007). Da der in dieser Studie erfolgreich verwendete HRP-

konjugierte Antikörper (Korff *et al.*, 2007) nicht mehr verfügbar war, wurde erst mit Fluoreszenzfärbung und später mit einem anderen HRP-konjugierten Antikörper die CD40-Färbung in Schnitten der Aorta durchgeführt. Mit keinem der Ansätze konnte jedoch eine CD40-Färbung in der Aorta erzielt werden (Kapitel 4.1.4, Seite 79). Schwierigkeiten mit der endothelialen CD40-Färbung sind auch in anderen Fällen dokumentiert (Wagner *et al.*, 2011). Die Ursache hierfür ist das geringe Vorhandensein von CD40 auf der Zelloberfläche von Endothelzellen, das auf ca. $5-10 \times 10^3$ Kopien pro Zelle geschätzt wird (Karmann *et al.*, 1995). Als Vergleich, von CD31 gibt es ca. 1×10^6 Kopien auf der Zelloberfläche (Newman, 1994).

5.1.4. Einfluss von CD40 auf Arteriogenese

Nicht nur die Atherosklerose sondern auch die Arteriogenese ist ein stark durch Entzündungsreaktionen beeinflusster Prozess (Ivo *et al.*, 2003). Deshalb war geplant, auch den Einfluss von CD40 auf die Monozytenrekrutierung bei der Arteriogenese mittels der induzierbaren endothelialen CD40-KO Mauslinie zu untersuchen. Als Arteriogenesemodell wurde die Ligatur einer Verästelung der *Arteria auricularis caudalis* in der Mausohrmuschel gewählt, da dieses in der eigenen Arbeitsgruppe seit vielen Jahren erfolgreich verwendet wird (Demicheva *et al.*, 2008). Mithilfe von Laser Speckle Kontrast Bildgebung (LSCI) wurde erfolgreich das Ausbleiben der Durchblutung nach Ligatur und deren Wiederherstellung nach Eintritt der Arteriogenese dokumentiert (Abbildung 18, Seite 81). LSCI eignete sich gut, um die generelle Durchblutung zu visualisieren, und wird deshalb auch oft in Modellen für Schlaganfall (Qin *et al.*, 2012), Angiogenese (Poole *et al.*, 2014) und Brandwunden (Ragol *et al.*, 2015) eingesetzt. Auch bei der Arteriogenese wurde LSCI schon verwendet, um die Mehrdurchblutung von arteriogenetischen Arteriolen im Trapezmuskel zu zeigen (Bruce *et al.*, 2014). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Ligaturmodell einer Ohrmuschelarterie war jedoch aufgrund des nahen Beieinanderliegens von Arterien und Venen in der Ohrmuschel ein Unterscheiden dieser mittels LSCI nicht möglich.

Mithilfe einer Partikelfärbung des arteriellen Blutsystems konnten die Arterien und Arteriolen im Mausohr visualisiert werden. Dabei wurde bei Arteriolen nebst der optisch deutlich sichtbaren Schlängelung eine signifikante Zunahme ($+ 7,77 \pm 1,03 \mu\text{m}$, entspricht $+ 74 \pm 10 \%$) des Gefäßdurchmesser nach Arteriogenese verzeichnet (Abbildung 19, Seite 82). Die Zunahme um ca. 74 % deckt sich mit durch andere Gruppen gemessenen Arterienvergrößerung um ca. 65 % in der Ohrmuschel von Mäusen nach Arteriogenese (Billaud *et al.*, 2011).

Weiterhin konnten wie bereits publiziert (Bruce *et al.*, 2014) mit immunohistologischen Färbemethoden nach Induzierung der Arteriogenese im Gewebe rund

um die Arteriolen Monozyten/Makrophagen nachgewiesen werden, nicht jedoch bei Kontrollarteriolen (Abbildung 20, Seite 83).

5.2. Perfusionsversuche in ibidi Y-Slides

Für eine *in vitro*-Untersuchung des Einflusses von CD40L-Stimulation auf das Adhäsionsverhalten von Monozyten in der Gefäßverzweigung wurden ibidi Y-Slides verwendet. Mit HUVECs besiedelte Y-Slides simulierten dabei eine Gefäßverzweigung, die mit einer Thrombozyten-, Monozyten- und Erythrozytenhaltigen Lösung perfundiert wurde.

Bei wiederholten Perfusionen des Y-Slides wurde festgestellt, dass auch ohne CD40L-Stimulation eine sehr hohe Freisetzung von ULVWF-Multimeren und eine dadurch ermöglichte Adhäsion von Thrombozyten und Monozyten erfolgte. Aufgrund dieser hohen basalen Aktivität konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der totalen Anzahl freigesetzter ULVWF-Multimere, der Länge der ULVWF-Multimere und der totalen Anzahl der an die ULVWF-Multimere adhärierenden Monozyten zwischen Perfusionsversuchen mit und ohne CD40L-Stimulation festgestellt werden (Abbildung 24, Seite 86). Möglicherweise war die rechteckige Geometrie des Slides dafür verantwortlich, dass der Fluss die Endothelzellen, Thrombozyten und Monozyten in ähnlichem Maße wie CD40L aktivierte. Dazu beigetragen haben könnte auch das ruckartige Anspringen der ibidi-Perfusionspumpe jeweils nach Zugabe von Thrombozyten, Monozyten oder Stimulans. Ein weiterer Einflussfaktor könnten die Kultivierungsbedingungen sein. Nach der Aussaat im Slide wurden die Zellen zwar unter nicht-statischen Bedingungen kultiviert (Kapitel 3.7.1, Seite 63), aber der Wechsel zur Perfusion bei einer Schubspannung von 10 dyn/cm² könnte die Endothelzellen aktiviert haben.

Obschon bezüglich der totalen Anzahl freigesetzter ULVWF-Multimere und adhärrender Monozyten nach CD40L-Stimulation keine signifikanten Unterschiede feststellbar waren, konnten bei der prozentualen Verteilung von ULVWF-Multimeren und adhärierenden Monozyten im Slide signifikante Unterschiede nachgewiesen werden. Dass nach einer Verzweigung mehr ULVWF-Multimere freigesetzt werden (Abbildung 25, Seite 87), ist auch aus anderen *in vitro*-Versuchsansätzen mit Flusskammern bekannt (Zheng *et al.*, 2015). Grund dafür sind Änderungen in der Gefäßgeometrie und dadurch in der Fließgeschwindigkeit und Schubspannung (Abbildung 38, Seite 103).

Im gesamten Y-Slide herrschen laminare Flussbedingungen, allerdings ermöglicht die verminderte Schubspannung nach der Verzweigung die Zunahme an adhärierenden Monozyten (Abbildung 26, Seite 87). So wurde ebenfalls in Y-Slides gezeigt, dass im Bereich der Verzweigung die Notch1-Expression geringer ist, aufgrund der dort ebenso verminderten Schubspannung (Mack *et*

al., 2017). *In vivo* sind Gefäßverzweigungen nicht nur Bereiche mit verminderter Schubspannung, sondern auch mit nicht-laminarem Fluss. Diese Bedingungen ermöglichen die Bildung von atherosklerotischen Plaques (Warboys *et al.*, 2011). Somit konnte im *in vitro* System der Gefäßverzweigung eine erhöhte ULVWF-Multimer-Freisetzung und Monozytenadhäsion im Bereich nach der Verzweigung gezeigt werden, der *in vivo* einer typischen Prädilektionsstelle für Atherosklerose entspricht. Die Y-Slides stellen folglich eine adäquate Repräsentation der Gefäßverzweigungen *in vivo* dar.

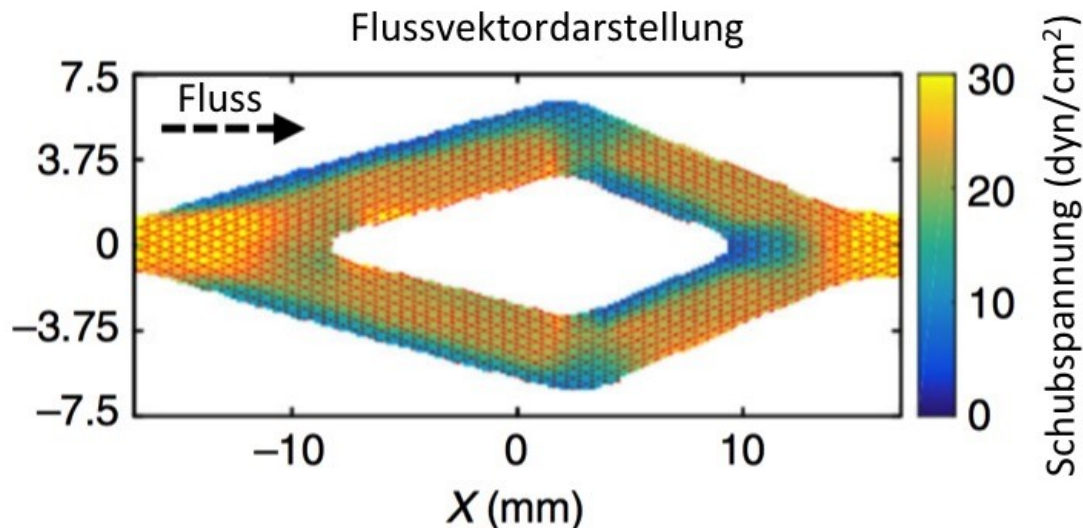


Abbildung 38: Schubspannung im Y-Slide

Schubspannungswerte im ibidi Y-Slide wurden mithilfe von Magnetresonanztomographie ermittelten Fließgeschwindigkeitswerten berechnet. Im Bereich nach der Verzweigung und vor dem Zusammenfluss ist die Schubspannung jeweils ca. halb so groß wie im Bereich davor, respektive danach (Abbildung modifiziert nach (Mack *et al.*, 2017)).

Ein weiterer Effekt der CD40L-Stimulation war eine geringe, aber signifikante Abnahme ($-7,32 \pm 2,94$ %) der Anzahl adhärrierender Monozyten am Ende von ULVWF-Multimeren im gesamten Y-Slide (Abbildung 27, Seite 88). Eine Erklärung hierfür könnte im Aufbau der ULVWF-Multimere liegen. Sie sind nach ihrer Freisetzung aus den Weibel-Palade-Körperchen an ihrem Anfang und in der Mitte an einzelnen Punkten an der Endothelzellschicht verankert, ihr Ende schwebt frei im Blutstrom. In der Abwesenheit von ADAMTS-13 findet keine Spaltung der ULVWF-Multimere statt und Thrombozyten adhärrieren auf der gesamten Länge. Adhärrieren nun zusätzlich vermehrt Monozyten an das Ende des schon mit Thrombozyten besetzten ULVWF-Multimers, so könnte dessen Strömungswiderstand zu groß werden und dieser von der Endothelzellenoberfläche abreißen. Zurück bleiben würden kürzere ULVWF-Multimere und solche, bei denen die Monozyten nicht am Ende adhärrieren. Ein Indiz hierfür ist die nicht signifikante Abnahme der Anzahl ($-162,99 \pm 97,86$) und Länge ($-9,22 \pm 7,33$ μm) der ULVWF-Multimere (Abbildung 24, Seite 86).

Das Y-Slide stellt somit ein vereinfachtes Modell einer Gefäßverzweigung dar, mit dem die Lokalisation der Freisetzung von ULVWF-Multimeren und der Adhäsion von Monozyten an bekannten Prädilektionsstellen für die Atherosklerose nachgewiesen werden kann. Im Slide wurde zwar mit 10 dyn/cm^2 eine Schubspannung erzeugt, die nahe an der natürlichen Schubspannung von 11.6 dyn/cm^2 in der humanen *Arteria carotis communis* liegt (Cheng *et al.*, 2007), jedoch ist das Slide mit seiner rechteckigen Geometrie, seiner Ausmessung und seiner fehlenden Elastizität weit entfernt von dem natürlichen parabolischen Geschwindigkeitsprofil in geraden unverzweigten Blutgefäßen. Auch erschweren die hohe basale Freisetzung von ULVWF-Multimeren und Adhäsion von Monozyten den Vergleich zwischen Kontrollversuchen ohne und solchen mit CD40L-Stimulation. Aus diesen Gründen wurde ein Perfusionssystem mit einer echten Gefäßverzweigung etabliert.

5.3. *Ex vivo*-Perfusionsmodell einer Gefäßverzweigung

In vivo-Versuche weisen zwar eine hohe Komplexität auf, spiegeln jedoch die zu untersuchende Problematik in ihrer natürlichen Form wider. Versuche mit *in vitro*-Modellen ermöglichen durch den Einsatz von Inhibitoren bzw. Stimulantien die Untersuchung von spezifischen Interaktionen, sind aber Artefakt-behaftet, weil sie oft das Umfeld, in dem diese Interaktionen stattfinden, vernachlässigen.

Obschon die Perfusion von freipräparierten Blutgefäßen für verschiedene Anwendungen, wie z.B. die Untersuchung der Reaktion auf mechanische Stimuli (Prasad *et al.*, 2014) oder Langzeitperfusion in einer Polymermatrix (Wang *et al.*, 2012) erprobt wurde, gibt es bislang kein publiziertes Modell, das eine Gefäßverzweigung verwendet.

Ausgewählt wurde die Karotisverzweigung, nebst ihrer Prädilektion für atherosklerotische Plaquebildung (Asakura und Karino, 1990), aufgrund ihres vergleichsweise einfachen Aufbaus. Die Perfusion der Arterie mit DMEM anstatt Blut verändert die Rheologie, indem durch das Fehlen der zellulären Blutbestandteile die Viskosität von $3\text{-}4 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ (Schmidt *et al.*, 2011) auf ca. $1 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ abnimmt. Bei einem Viskositätswert von $1 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ weisen Thrombozyten eine verminderte, aber noch ausreichende Adhäsion auf (van Breugel *et al.*, 1992).

Wie auch im statischen Y-Slide (Abbildung 25, Seite 87) konnte in der Karotisverzweigung eine verstärkte Bildung von ULVWF-Multimeren in und nach der Verzweigung nach sCD40L-Stimulation dokumentiert werden (Abbildung 30, Seite 91). Dies stimmt mit publizierten Beobachtungen an

anderen Modellsystemen von Flusskammern überein, die eine erhöhte vWF-Freisetzung nach Verzweigungen feststellen (Zheng *et al.*, 2015).

Das Perfusionssystem der Karotisverzweigung sollte in allen Faktoren so nahe wie möglich an den *in vivo*-Bedingungen liegen. Einer dieser Faktoren, neben z.B. Temperatur, CO₂-Gehalt und Gefäßgeometrie, ist die vom Fluss und Gefäßdurchmesser abhängige Schubspannung. Die im Gefäß auftretende Schubspannung ist unter anderem für die endotheliale Bildung von NO (Balligand *et al.*, 2009) und das Entfalten der ULVWF-Multimere (Gogia und Neelamegham, 2015) verantwortlich. Bei den meisten durchgeführten Perfusionsexperimenten traten in der *Arteria carotis communis* Fließgeschwindigkeiten von 600-700 µl/min auf, was einer Schubspannung von maximal 20-30 dyn/cm² entspricht. In der *Arteria carotis communis* der Maus tritt *in vivo* eine mittlere Schubspannung von 64,8 dyn/cm² mit Minimal- bzw. Maximalwerten von 28 bzw. 142 dyn/cm² (Cheng *et al.*, 2007) auf. Die im Perfusionssystem der Gefäßverzweigung herrschenden Schubspannungswerte befinden sich somit am unteren Ende der *in vivo*-Werte, liegen aber durchaus im physiologischen Bereich.

Bei einigen Perfusionsexperimenten wurden nur niedrige Perfuisionsraten von ca. 300 µl/min und dementsprechend eine Schubspannung von maximal 10 dyn/cm² erreicht. Dadurch trat eine signifikante Erhöhung der im Gefäß adhärierenden Monozyten auf (Abbildung 33, Seite 93). Insbesondere niedrige Volumenströme und Scherkräfte sind eine bekannte Voraussetzung für die Bildung von atherosklerotischen Plaques (Warboys *et al.*, 2011). Die Perfuisionsexperimente wurden letztlich mit einer durchschnittlichen Perfuisionsrate von 600-700 µl/min durchgeführt. Somit herrschten vor der Verzweigung laminare und nach der Verzweigung, aufgrund des sich verkleinernden Gefäßdurchmessers, verlangsamte und potentiell nicht-laminare Flussbedingungen.

5.3.1. Einfluss der CD40L-Stimulation auf die Monozytenadhäsion

An Verzweigungen atherosklerotischer Gefäße ist bekanntermaßen die CD40-Expression erhöht (Korff *et al.*, 2007). Deshalb war die Erwartung, dass zumindest die ApoE-KO Mauslinie an diesen Stellen unterschiedlich auf die CD40L-Stimulation reagiert. Generell wurde erwartet, dass ohne Stimulation keine oder eine nur sehr geringe Monozytenadhäsion aufgrund von Flussbedingter vWF-Freisetzung feststellbar ist. Nach CD40L-Stimulation wurde generell eine moderat erhöhte vWF-Freisetzung und ggf. Monozytenadhäsion erwartet. Bei CD40-KO Mäusen wurde aufgrund des fehlenden CD40-Rezeptors sowohl mit als auch ohne Stimulation keine CD40L-bedingte vWF-Freisetzung und Monozytenadhäsion erwartet. Bei vWF-KO Mäusen wurde aufgrund des fehlenden vWF sowohl mit als auch ohne Stimulation keine ULVWF-Multimer-

vermittelte Monozytenadhäsion erwartet. Bei den ApoE-KO Mäusen wurde ein erhöhtes Vorkommen des CD40-Rezeptors an den Prädilektionsstellen für Atherosklerose vermutet und folglich nach CD40L-Stimulation eine deutlich erhöhte Monozytenadhäsion im Vergleich zu anderen Mauslinien erwartet. Allerdings handelte es sich um relativ junge ApoE-KO Mäuse ohne Cholesterinfütterung (Hochfettdiät) und bei diesen Tieren sind erste atherosklerotische Läsionen (Fettstreifenbildung) nicht vor einem Alter von 3 Monaten zu erwarten (Meir und Leitersdorf, 2004).

Wie aus Abbildung 35, Seite 95 ersichtlich ist, wichen die erzielten Ergebnisse teilweise von den erwarteten Ergebnissen ab. Nur im Fall der Gefäße aus ApoE-KO Mäuse ergab sich ein hoch signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl adhärrierender Monozyten zwischen Perfusionsversuchen mit und ohne CD40L-Stimulation. Auch kam es in den Gefäßen der CD40-KO Mäuse zu einer moderaten Monozytenadhäsion, die zwar nicht CD40L-stimulierbar war, sich aber nicht von der basalen Adhäsion in Wildtyp-Gefäßen unterschied. Eine mögliche Erklärung für das Auftreten von Monozytenadhäsion in CD40-KO Gefäßen könnte darin liegen, dass CD40L auch ohne den CD40-Rezeptor mit Monozyten interagieren kann. Es ist bekannt, dass sCD40L mit dem auf Monozyten und Makrophagen vorkommenden Adhäsionsmolekül MAC-1 interagieren kann und die Monozyten somit aktiviert und zur Interaktion mit Endothelzellen verhilft (Antoniades *et al.*, 2009). In den Gefäßen von Mauslinien mit CD40 tritt jedoch auch ohne CD40L-Stimulation Monozytenadhäsion auf. Dafür könnte eine basale, Fluss-bedingte vWF-Freisetzung oder eine vWF-unabhängige Monozytenadhäsion verantwortlich sein. VWF-Färbungen bei Gefäßen mit und ohne CD40L-Stimulation könnten zeigen, ob die in allen Mauslinien vorkommende Monozytenadhäsion ohne CD40L-Stimulation vWF-vermittelt ist. Das Vorhandensein der basalen Monozytenadhäsion in den Gefäßen der vWF-KO Mauslinie spricht dafür, dass zumindest bei diesen Tieren die Monozytenadhäsion über einen vWF-unabhängigen Mechanismus vermittelt wird. Möglicherweise ist die Monozytenadhäsion in Abwesenheit von CD40L sowohl vWF-abhängig als auch unabhängig vermittelt.

Im Umkehrschluss wäre zu erwarten, dass ein Blockieren des CD40-Rezeptors die Anzahl adhärrierender Monozyten vermindert und hemmend auf das Voranschreiten der Atherosklerose wirkt. So konnte in auf CD40-CD40L Interaktionen fokussierten Versuchen gezeigt werden, dass aufgrund der Blockierung des CD40L in ApoE-KO Mäusen mithilfe von anti-CD40L-Antikörpern die vorhandenen atherosklerotischen Plaques einen verminderten entzündungsfördernden und stabileren Phänotyp annehmen (Schönbeck *et al.*, 2000). Weil jedoch das Blockieren von CD40L längerfristig für Probleme mit dem Immunsystem sorgt, wurde auch dort festgestellt, dass der CD40-Rezeptor ein besseres Ziel für Therapieansätze ist. So führt die Blockierung von CD40-TRAF6 Interaktionen zu einer reduzierten Adhäsion von Monozyten an die Gefäßwand

und polarisierte die Makrophagen zu entzündungshemmenden M2 Makrophagen (Lutgens *et al.*, 2010).

5.3.2. Flussdarstellung

Es ist bekannt, dass ein laminares bzw. nicht-laminares Strömungsprofil des Blutes einen Einfluss auf die Prädilektionsstellen der atherosklerotischen Plaquebildung hat (Warboys *et al.*, 2011). Zur Darstellung des Blutflusses in Verzweigungen gibt es die verschiedensten Möglichkeiten. Zu Beginn wurde aus Abdrücken von echten Gefäßen oder aus nachgebauten Modellen ein künstliches Gefäß aus Glas hergestellt. Mittels Wasserstoffbläschen oder Farbstoffen lässt sich der Fluss in diesen Glasmodellen visualisieren (Bharadvaj *et al.*, 1982). Diese Modelle haben jedoch den großen Nachteil, völlig starr zu sein. Mittels Ultraschall gibt es basierend auf dem Doppler-Effekt viele Möglichkeiten, nicht nur das Gewebe, sondern auch den darin stattfindenden Blutfluss darzustellen (Sengupta *et al.*, 2012). Dabei ist es sogar möglich, ein Blutgefäß *ex vivo* mittels Ultraschall zu untersuchen, nachdem dieses in Gelatine eingebettet wurde (Kothapalli und Wang, 2009). Mithilfe mathematischer Modelle ist es möglich, nicht nur eine Verzweigung darzustellen (Tezduyar *et al.*, 2007), sondern auch ganze arterielle Netzwerke (Tomer *et al.*, 2010). Dabei können die mathematischen Modelle auch die Elastizität des Gewebes mit einberechnen.

In dieser Studie wurde zur Visualisierung die LSCI-Methode verwendet. Diese Methode fing als photographische Einzelbildaufnahme des Blutflusses an (Fercher und Briers, 1981). In den letzten Jahren wurde die Methode weiterentwickelt, so dass Live-Aufnahmen mit Angabe der Blutfließgeschwindigkeit möglich sind (Kong *et al.*, 2016). Allerdings wurde das Gefäß nicht wie sonst mit DMEM, sondern mit humanem Vollblut perfundiert, da LSCI den Blutfluss anhand der Bewegung von Erythrozyten erkennt. Mit ca. 7 µm Durchmesser unterscheiden sich humane Erythrozyten (Turgeon, 2005) nicht stark von murinen Erythrozyten, die einen Durchmesser von ca. 6 µm besitzen (Withers, 1992).

LSCI zeigt nicht die Richtung des Blutflusses an, sondern die Geschwindigkeit der sich darin bewegenden Erythrozyten. Wie in Abbildung 37, Seite 97 ersichtlich ist, war im Bereich vor der Verzweigung entgegen der Erwartung nicht ein perfekt laminarer Fluss vorhanden, jedoch erwartungsgemäß in der Verzweigung ein deutlich nicht-laminar Fluss. Es kann angenommen werden, dass den Geschwindigkeitsänderungen jeweils Richtungsänderungen aufgrund von Verwirbelungen zugrunde liegen. Ferner ist zu sehen, dass jeweils in der Mitte des Gefäßes eine höhere Fließgeschwindigkeit herrscht als an den Rändern. Dies deckt sich mit dem parabolischen Strömungsprofil des Blutes unter laminaren Flussbedingungen (Klabunde, 2011). Es kann somit

angenommen werden, dass das *ex vivo*-Gefäßverzweigungsperfusionsmodell die *in vivo* auftretenden Flussbedingungen relativ getreu wiedergibt und sich somit als Perfusionsmodell für Prädilektionsstellen der Atherosklerose eignet.

5.4. Ausblick

Die ApoE-KO Mauslinie mit induzierbarem endotheliale CD40-KO hatte viel Potential, weshalb das Scheitern der Verifizierung ein großer Rückschlag für diese Arbeit war.

Als Alternative zur üblichen Erzeugung von Knockout- und Knockin-Mauslinien etablierte sich in den letzten Jahren die CRISPR/Cas-Methode. Einer ihrer Vorteile ist, dass Mutanten innerhalb von weniger als 3 Monaten ohne die sonst nötige zusätzliche Verpaarung für Tochtergenerationen erzeugt und genotypisiert werden können. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass diese Methode aufgrund der kurzen Zielsequenz von 23 Nukleotiden eine verringerte Spezifität hat und sich vor allem für einfache Genom-weite Deletions- und Insertionsansätze eignet (Harms *et al.*, 2014). In dieser Arbeit hätte der KO nicht nur Gewebe-spezifisch, sondern auch induzierbar sein sollen. Es gibt zwar induzierbare und Gewebe-spezifische CRISPR/Cas-Mauslinien, die Cre-Rekombinase abhängig und mit loxP-Stellen versehen sind, deren Erzeugung ist allerdings umständlicher und langwieriger als ein einfacher Genom-weiter Knockout oder Knockin (Katigbak *et al.*, 2018). Somit könnte die CRISPR/Cas-Methode alternativ zwar zur erneuten Erzeugung der induzierbaren Endothel-spezifischen CD40-KO Mauslinie verwendet werden, würde aber keine direkten Vorteile gegenüber der etablierten Methodik gewähren.

Mit der Etablierung des Perfusionsystems der Karotisverzweigung wurde ein neuartiges *ex vivo*-Perfusionsmodell erzeugt, das Potential zur Beantwortung vieler interessanter Fragestellungen hat. Wie jedes Modellsystem hat es auch das Potential zur Verbesserung. In zukünftigen Experimenten könnte zum Beispiel die Viskosität des Perfusionsmediums angepasst werden, um eher der von Blut zu entsprechen. Dazu könnten aus Mausblut isolierte Erythrozyten dem Perfusionsmedium zugegeben werden, bis ein natürlicher Hämatokritwert erreicht wird. Die Flussgeschwindigkeits- und Schubspannungsbedingungen sind an der unteren Grenze der in Mäusen auftretenden Werte, könnten also noch erhöht werden.

Die 2-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie hat den Vorteil einer höheren Eindringtiefe und eignet sich somit für Beobachtungen *in vivo* (Centonze und White, 1998). So wurde diese Technik von einem Kooperationspartner bereits für die Bestimmung der Schubspannung mittels Blutflussmessung an lebendigen Tieren verwendet (Lasch *et al.*, 2018). Damit wird momentan auch die Monzyten-

diapedese in der Mikrozirkulation des Kremastermuskels und der Karotisverzweigung nachverfolgt. Somit bietet sich die 2-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie als *in vivo*-Alternative zum Perfusionsmodell der Gefäßverzweigung an, bzw. kann mit dieser kombiniert werden. Fluoreszenzaufnahmen der Gefäße im Perfusionsmodell der Gefäßverzweigung könnten sowohl nach als auch während der Perfusion erfolgen. Dabei würden die Aufnahmen von der höheren Eindringtiefe und vermindert auftretenden unspezifischen Fluoreszenz profitieren.

Möglicherweise könnte die Verwendung einer gerade in Zucht befindlichen CD40 und ApoE doppel-KO Mauslinie für Versuche mit der Perfusionsplattform zurück zur ursprünglichen Fragestellung dieser Arbeit, dem Einfluss von CD40 auf das Voranschreiten der Atherosklerose, führen. Damit wird als Alternative zur induzierbaren endothelialen CD40-KO Mauslinie erneut untersucht werden können, ob die Abwesenheit von CD40 an den Prädilektionsstellen für Atherosklerose in der Frühphase die Endothel-Monozyten Interaktionen beeinflusst.

6. Literaturverzeichnis

- Aarts, S. A. B. M., Seijkens, T. T. P., van Dorst, K. J. F., Dijkstra, C. D., Kooij, G. und Lutgens, E. (2017). **The CD40-CD40L Dyad in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis**. *Frontiers in Immunology* 8, doi: 10.3389/fimmu.2017.01791.
- Aird, W. C. (2007). **Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium**. I. Structure, Function, and Mechanisms 100, 158-173, doi: 10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a.
- Aloui, C., Prigent, A., Sut, C., Tariket, S., Hamzeh-Cognasse, H., Pozzetto, B., Richard, Y., Cognasse, F., Laradi, S. und Garraud, O. (2014). **The Signaling Role of CD40 Ligand in Platelet Biology and in Platelet Component Transfusion**. *International Journal of Molecular Sciences* 15, 22342-22364, doi: 10.3390/ijms151222342.
- Andrés-Manzano, M. J., Andrés, V. und Dorado, B. (2015). **Oil Red O and Hematoxylin and Eosin Staining for Quantification of Atherosclerosis Burden in Mouse Aorta and Aortic Root**. In: *Methods in Mouse Atherosclerosis*, Hrsg. Andrés, V. und Dorado, B., Springer New York, New York, NY, S. 85-99.
- Antoniades, C., Bakogiannis, C., Tousoulis, D., Antonopoulos, A. S. und Stefanadis, C. (2009). **The CD40/CD40 Ligand System: Linking Inflammation With Atherothrombosis**. *Journal of the American College of Cardiology* 54, 669-677, doi: 10.1016/j.jacc.2009.03.076.
- Asakura, T. und Karino, T. (1990). **Flow patterns and spatial distribution of atherosclerotic lesions in human coronary arteries**. *Circulation Research* 66, 1045-1066, doi: 10.1161/01.Res.66.4.1045.
- Austyn, J. M. und Gordon, S. (1981). **F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage**. *European Journal of Immunology* 11, 805-815, doi: 10.1002/eji.1830111013.
- Balligand, J.-L., Feron, O. und Dessy, C. (2009). **eNOS Activation by Physical Forces: From Short-Term Regulation of Contraction to Chronic Remodeling of Cardiovascular Tissues**. *Physiological Reviews* 89, 481-534, doi: 10.1152/physrev.00042.2007.
- Bharadvaj, B. K., Mabon, R. F. und Giddens, D. P. (1982). **Steady flow in a model of the human carotid bifurcation. Part I—Flow visualization**. *Journal of Biomechanics* 15, 349-362, doi: 10.1016/0021-9290(82)90057-4.
- Billaud, M., Ross, J. A., Greyson, M. A., Bruce, A. C., Seaman, S. A., Heberlein, K. R., Han, J., Best, A. K., Peirce, S. M. und Isakson, B. E. (2011). **A new method for in vivo visualization of vessel remodeling using a near-infrared**

- dye.** Microcirculation (New York, N.Y. : 1994) 18, 163-171, doi: 10.1111/j.1549-8719.2011.00085.x.
- Blair, P. und Flaumenhaft, R. (2009). **Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates.** Blood reviews 23, 177-189, doi: 10.1016/j.blre.2009.04.001.
- Britta, E. und Hartwig, W. (2004). **Mini - review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house?** European Journal of Immunology 34, 2955-2963, doi: 10.1002/eji.200425327.
- Bruce, A. C., Kelly-Goss, M. R., Heuslein, J. L., Meisner, J. K., Price, R. J. und Peirce, S. M. (2014). **Monocytes are Recruited from Venules during Arteriogenesis in the Murine Spinotrapezius Ligation Model.** Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 34, 2012-2022, doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303399.
- Canobbio, I., Balduini, C. und Torti, M. (2004). **Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex.** Cellular Signalling 16, 1329-1344, doi: 10.1016/j.cellsig.2004.05.008.
- Cattaruzza, M., Guzik, T. J., Slodowski, W., Pelvan, A., Becker, J., Halle, M., Buchwald, A. B., Channon, K. M. und Hecker, M. (2004). **Shear stress insensitivity of endothelial nitric oxide synthase expression as a genetic risk factor for coronary heart disease.** Circ Res 95, 841-847, doi: 10.1161/01.RES.0000145359.47708.2f.
- Cattaruzza, M., Wagner, A. H. und Hecker, M. (2012). **Mechanosensitive Pro-inflammatory Gene Expression in Vascular Cells.** Mechanical Stretch and Cytokines. Mechanosensitivity in Cells and Tissues 5, 59-86, doi: 10.1007/978-94-007-2004-6_3.
- Centonze, V. E. und White, J. G. (1998). **Multiphoton Excitation Provides Optical Sections from Deeper within Scattering Specimens than Confocal Imaging.** Biophysical Journal 75, 2015-2024, doi: 10.1016/S0006-3495(98)77643-X.
- Chatzigeorgiou, A., Lyberi, M., Chatzilymperis, G., Nezos, A. und Kamper, E. (2009). **CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease.** BioFactors 35, 474-483, doi: 10.1002/biof.62.
- Cheng, C., Helderma, F., Tempel, D., Segers, D., Hierck, B., Poelmann, R., van Tol, A., Duncker, D. J., Robbers-Visser, D., Ursem, N. T. C., van Haperen, R., Wentzel, J. J., Gijzen, F., van der Steen, A. F. W., de Crom, R. und Krams, R. (2007). **Large variations in absolute wall shear stress levels within one species and between species.** Atherosclerosis 195, 225-235, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.11.019.

- Claxton, S., Kostourou, V., Jadeja, S., Chambon, P., Hodivala-Dilke, K. und Fruttiger, M. (2008). **Efficient, inducible Cre-recombinase activation in vascular endothelium.** *genesis* 46, 74-80, doi: 10.1002/dvg.20367.
- Dave, T., Ezhilan, J., Vasnawala, H. und Somani, V. (2013). **Plaque regression and plaque stabilisation in cardiovascular diseases.** *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* 17, 983-989, doi: 10.4103/2230-8210.122604.
- De Ceunynck, K., De Meyer, S. F. und Vanhoorelbeke, K. (2013). **Unwinding the von Willebrand factor strings puzzle.** *Blood* 121, 270-277, doi: 10.1182/blood-2012-07-442285.
- Demicheva, E., Hecker, M. und Korff, T. (2008). **Stretch-Induced Activation of the Transcription Factor Activator Protein-1 Controls Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression During Arteriogenesis.** *Circulation Research* 103, 477-484, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.177782.
- Dimitris, T., Anna-Maria, K., Costas Tentolouris Nikolaos, P. und Christodoulos, S. (2012). **The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function.** *Current Vascular Pharmacology* 10, 4-18, doi: 10.2174/157016112798829760.
- Dong, J.-f. (2005). **Cleavage of ultra - large von Willebrand factor by ADAMTS - 13 under flow conditions.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3, 1710-1716, doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01360.x.
- Elgueta, R., Benson, M. J., de Vries, V. C., Wasiuk, A., Guo, Y. und Noelle, R. J. (2009). **Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system.** *Immunological reviews* 229, 10.1111/j.1600-1065X.2009.00782.x, doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x.
- Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D. und Chambon, P. (1996). **Ligand-activated site-specific recombination in mice.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 10887-10890.
- Félétou, M. (2011). **Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease.** In: *The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*, Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA).
- Fercher, A. F. und Briers, J. D. (1981). **Flow visualization by means of single-exposure speckle photography.** *Optics Communications* 37, 326-330, doi: 10.1016/0030-4018(81)90428-4.
- Francke, A., Herold, J., Weinert, S., Strasser, R. H. und Braun-Dullaeus, R. C. (2011). **Generation of Mature Murine Monocytes from**

- Heterogeneous Bone Marrow and Description of Their Properties.** Journal of Histochemistry and Cytochemistry 59, 813-825, doi: 10.1369/0022155411416007.
- Gibson, C. M., Diaz, L., Kandarpa, K., Sacks, F. M., Pasternak, R. C., Sandor, T., Feldman, C. und Stone, P. H. (1993). **Relation of vessel wall shear stress to atherosclerosis progression in human coronary arteries.** Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 13, 310-315, doi: 10.1161/01.Atv.13.2.310.
- Gogia, S. und Neelamegham, S. (2015). **Role of fluid shear stress in regulating VWF structure, function and related blood disorders.** Biorheology 52, 319-335, doi: 10.3233/BIR-15061.
- Harms, D. W., Quadros, R. M., Seruggia, D., Ohtsuka, M., Takahashi, G., Montoliu, L. und Gurumurthy, C. B. (2014). **Mouse Genome Editing using CRISPR/Cas System.** Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L. Haines ... [et al.] 83, 15.17.11-15.17.27, doi: 10.1002/0471142905.hg1507s83.
- Huang, J., Roth, R., Heuser, J. E. und Sadler, J. E. (2009). **Integrin $\alpha(v)\beta(3)$ on human endothelial cells binds von Willebrand factor strings under fluid shear stress.** Blood 113, 1589-1597, doi: 10.1182/blood-2008-05-158584.
- ibidi (2015a). **ibidi Pump System.** URL: https://ibidi.com/img/cms/products/instruments/I_1090X_PumpSystem/I_109XX_PumpSystem_image1.jpg [Stand:25.4.2018].
- ibidi (2015b). **μ -Slide Membrane ibiPore Flow.** URL: https://ibidi.com/img/cms/products/labware/channel_slides/S_850XX_Membrane_ibiPore_Flow/IN_850XX_Membrane_ibiPore_Flow.pdf [Stand:25.4.2018].
- Italiani, P. und Boraschi, D. (2014). **From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation.** Frontiers in Immunology 5, 514, doi: 10.3389/fimmu.2014.00514.
- Ivo, B., Matthias, H., Marco, J. und Wolfgang, S. (2003). **Influence of Inflammatory Cytokines on Arteriogenesis.** Microcirculation 10, 371-379, doi: 10.1038/sj.mn.7800199.
- Jakubzick, C. V., Randolph, G. J. und Henson, P. M. (2017). **Monocyte differentiation and antigen-presenting functions.** Nature Reviews Immunology 17, 349, doi: 10.1038/nri.2017.28.
- Karmann, K., Hughes, C. C., Schechner, J., Fanslow, W. C. und Pober, J. S. (1995). **CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression.** Proceedings

- of the National Academy of Sciences 92, 4342-4346, doi: 10.1073/pnas.92.10.4342.
- Katigbak, A., Robert, F., Paquet, M. und Pelletier, J. (2018). **Inducible Genome Editing with Conditional CRISPR/Cas9 Mice**. G3: Genes|Genomes|Genetics 8, 1627-1635, doi: 10.1534/g3.117.300327.
- Kaufmann, B. A., Carr, C. L., Belcik, J. T., Xie, A., Yue, Q., Chadderdon, S., Caplan, E. S., Khangura, J., Bullens, S., Bunting, S. und Lindner, J. R. (2010). **Molecular imaging of the initial inflammatory response in atherosclerosis: Implications for early detection of disease**. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 30, 54, doi: 10.1161/ATVBAHA.109.196386.
- Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T. und Kikutani, H. (1994). **The immune responses in CD40-deficient mice: Impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation**. Immunity 1, 167-178, doi: 10.1016/1074-7613(94)90095-7.
- Klabunde, R. (2011). **Cardiovascular Physiology Concepts**. In, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Kong, P., Zhou, Y.-l., Xie, Y.-y. und Jiang, M. (2016). **A novel highly efficient algorithm for laser speckle imaging**. Optik - International Journal for Light and Electron Optics 127, 5852-5859, doi: 10.1016/j.ijleo.2016.04.004.
- Korff, T., Aufgebauer, K. und Hecker, M. (2007). **Cyclic Stretch Controls the Expression of CD40 in Endothelial Cells by Changing Their Transforming Growth Factor- β 1 Response**. Circulation 116, 2288-2297, doi: 10.1161/circulationaha.107.730309.
- Kothapalli, S.-R. und Wang, L. V. (2009). **Ex vivo blood vessel imaging using ultrasound-modulated optical microscopy**. Journal of biomedical optics 14, 014015-014015, doi: 10.1117/1.3076191.
- Lasch, M., Nekolla, K., Klemm, A. H., Buchheim, J.-I., Pohl, U., Dietzel, S. und Deindl, E. (2018). **Estimating hemodynamic shear stress in murine peripheral collateral arteries by two-photon line scanning**. Molecular and Cellular Biochemistry, doi: 10.1007/s11010-018-3430-9.
- Lawson, C. und Wolf, S. (2009). **ICAM-1 signaling in endothelial cells**. Pharmacological Reports 61, 22-32, doi: 10.1016/S1734-1140(09)70004-0.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. und Nourshargh, S. (2007). **Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated**. Nature Reviews Immunology 7, 678, doi: 10.1038/nri2156.

- Lian, E. C.-Y. (2005). **Pathogenesis of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: ADAMTS13 Deficiency and Beyond**. *Semin Thromb Hemost* 31, 625-632, doi: 10.1055/s-2005-925468.
- Lindner, J. R. (2004). **Microbubbles in medical imaging: current applications and future directions**. *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 527, doi: 10.1038/nrd1417.
- Lutgens, E., Lievens, D., Beckers, L., Wijnands, E., Soehnlein, O., Zernecke, A., Seijkens, T., Engel, D., Cleutjens, J., Keller, A. M., Naik, S. H., Boon, L., Oufella, H. A., Mallat, Z., Ahonen, C. L., Noelle, R. J., de Winther, M. P., Daemen, M. J., Biessen, E. A. und Weber, C. (2010). **Deficient CD40-TRAF6 signaling in leukocytes prevents atherosclerosis by skewing the immune response toward an antiinflammatory profile**. *The Journal of Experimental Medicine* 207, 391-404, doi: 10.1084/jem.20091293.
- Mack, J. J., Mosqueiro, T. S., Archer, B. J., Jones, W. M., Sunshine, H., Faas, G. C., Briot, A., Aragón, R. L., Su, T., Romay, M. C., McDonald, A. I., Kuo, C.-H., Lizama, C. O., Lane, T. F., Zovein, A. C., Fang, Y., Tarling, E. J., de Aguiar Vallim, T. Q., Navab, M., Fogelman, A. M., Bouchard, L. S. und Iruela-Arispe, M. L. (2017). **NOTCH1 is a mechanosensor in adult arteries**. *Nature Communications* 8, 1620, doi: 10.1038/s41467-017-01741-8.
- Makinde, T. und Agrawal, D. K. (2008). **Intra and extravascular transmembrane signalling of angiopoietin-1-Tie2 receptor in health and disease**. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12, 810-828, doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00254.x.
- Meir, K. S. und Leitersdorf, E. (2004). **Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1006-1014, doi: 10.1161/01.ATV.0000128849.12617.f4.
- Möller, K., Adolph, O., Koffler, J., Elrod, J., Popa, M., Ghosh, S., Schwarz, M., Schwale, C., Grässle, S., Huck, V., Bruehl, C., Wieland, T., Schneider, S., Nobiling, R., Wagner, A. und Hecker, M. (2015). **Mechanism and functional impact of CD40 ligand-induced von Willebrand factor release from endothelial cells**. 113, doi: 10.1160/TH14-04-0336.
- Mow, V. C., Guilak, F., Tran-Son-Tay, R. und Hochmuth, R. M. (2012). **Cell Mechanics and Cellular Engineering**, Springer New York.
- Newby, A. C. (2008). **Metalloproteinase Expression in Monocytes and Macrophages and its Relationship to Atherosclerotic Plaque Instability**. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28, 2108-2114, doi: 10.1161/atvbaha.108.173898.

- Newman, P. J. (1994). **The Role of PECAM-1 in Vascular Cell Biology**. *Annals of the New York Academy of Sciences* 714, 165-174, doi: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb12041.x.
- Opal, S. M. und DePalo, V. A. (2000). **Anti-Inflammatory Cytokines**. *Chest* 117, 1162-1172, doi: 10.1378/chest.117.4.1162.
- Padilla, A., Moake, J. L., Bernardo, A., Ball, C., Wang, Y., Arya, M., Nolasco, L., Turner, N., Berndt, M. C., Anvari, B., López, J. A. und Dong, J.-F. (2004). **P-selectin anchors newly released ultralarge von Willebrand factor multimers to the endothelial cell surface**. *Blood* 103, 2150-2156, doi: 10.1182/blood-2003-08-2956.
- Parihar, A., Eubank, T. D. und Doseff, A. I. (2010). **Monocytes and Macrophages Regulate Immunity through Dynamic Networks of Survival and Cell Death**. *Journal of Innate Immunity* 2, 204-215, doi: 10.1159/000296507.
- Pepine, C. J. (1998). **The effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial dysfunction: potential role in myocardial ischemia**. *The American Journal of Cardiology* 82, 23S-27S, doi: 10.1016/S0002-9149(98)00805-4.
- Poole, K. M., McCormack, D. R., Patil, C. A., Duvall, C. L. und Skala, M. C. (2014). **Quantifying the vascular response to ischemia with speckle variance optical coherence tomography**. *Biomedical Optics Express* 5, 4118-4130, doi: 10.1364/BOE.5.004118.
- Popa, M., Tahir, S., Elrod, J., Kim, S. H., Leuschner, F., Kessler, T., Bugert, P., Pohl, U., Wagner, A. H. und Hecker, M. (2018). **Role of CD40 and ADAMTS13 in von Willebrand factor-mediated endothelial cell-platelet-monocyte interaction**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, E5556-E5565, doi: 10.1073/pnas.1801366115.
- Prasad, R. M., Jin, X., AbouAlaiwi, W. A. und Nauli, S. M. (2014). **Real-time vascular mechanosensation through ex vivo artery perfusion**. *Biological Procedures Online* 16, 6, doi: 10.1186/1480-9222-16-6.
- Qin, J., Shi, L., Dziennis, S., Reif, R. und Wang, R. K. (2012). **Fast synchronized dual-wavelength laser speckle imaging system for monitoring hemodynamic changes in a stroke mouse model**. *Optics letters* 37, 4005-4007.
- Ragol, S., Remer, I., Shoham, Y., Hazan, S., Willenz, U., Sinelnikov, I., Dronov, V., Rosenberg, L. und Bilenca, A. (2015). **Static laser speckle contrast analysis for noninvasive burn diagnosis using a camera-phone imager**. 20, doi: 10.1117/1.JBO.20.8.086009.
- Roser, M. (2018). **Life Expectancy**. URL: <https://ourworldindata.org/life-expectancy> [Stand].

- Ross, R. (1999). **Atherosclerosis — An Inflammatory Disease**. New England Journal of Medicine *340*, 115-126, doi: 10.1056/nejm199901143400207.
- Ross, R., Glomset, J. und Harker, L. (1977). **Response to injury and atherogenesis**. The American Journal of Pathology *86*, 675-684.
- Sadler, J. E. (1998). **Biochemistry and Genetics of von Willebrand Factor**. Annual Review of Biochemistry *67*, 395-424, doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.395.
- Scalia, R. (2013). **The microcirculation in adipose tissue inflammation**. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders *14*, 69-76, doi: 10.1007/s11154-013-9236-x.
- Schmidt, R. F., Lang, F. und Heckmann, M. (2011). **Physiologie des Menschen**. In: Mit Pathophysiologie, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Heidelberg.
- Schönbeck, U., Sukhova, G. K., Shimizu, K., Mach, F. und Libby, P. (2000). **Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *97*, 7458-7463.
- Seijkens, T. T. P., van Tiel, C. M., Kusters, P. J. H., Atzler, D., Soehnlein, O., Zarzycka, B., Aarts, S. A. B. M., Lameijer, M., Gijbels, M. J., Beckers, L., den Toom, M., Slütter, B., Kuiper, J., Duchene, J., Aslani, M., Megens, R. T. A., van't Veer, C., Kooij, G., Schrijver, R., Hoeksema, M. A., Boon, L., Fay, F., Tang, J., Baxter, S., Jongejan, A., Moerland, P. D., Vriend, G., Bleijlevens, B., Fisher, E. A., Duivenvoorden, R., Gerdes, N., de Winther, M. P. J., Nicolaes, G. A., Mulder, W. J. M., Weber, C. und Lutgens, E. (2018). **Targeting CD40-Induced TRAF6 Signaling in Macrophages Reduces Atherosclerosis**. Journal of the American College of Cardiology *71*, 527-542, doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.055.
- Sengupta, P. P., Pedrizzetti, G., Kilner, P. J., Kheradvar, A., Ebberts, T., Tonti, G., Fraser, A. G. und Narula, J. (2012). **Emerging Trends in CV Flow Visualization**. JACC: Cardiovascular Imaging *5*, 305-316, doi: 10.1016/j.jcmg.2012.01.003.
- Shen, L. E. I., Lu, G., Dong, N., Jiang, L., Ma, Z. und Ruan, C. (2012). **Von Willebrand factor, ADAMTS13 activity, TNF- α and their relationships in patients with chronic kidney disease**. Experimental and Therapeutic Medicine *3*, 530-534, doi: 10.3892/etm.2011.432.
- Sitia, S., Tomasoni, L., Atzeni, F., Ambrosio, G., Cordiano, C., Catapano, A., Tramontana, S., Perticone, F., Naccarato, P., Camici, P., Picano, E., Cortigiani, L., Bevilacqua, M., Milazzo, L., Cusi, D., Barlassina, C., Sarzi-Puttini, P. und Turiel, M. (2010). **From endothelial dysfunction to**

- atherosclerosis.** Autoimmunity Reviews 9, 830-834, doi: 10.1016/j.autrev.2010.07.016.
- Sonneveld, M. A. H., de Maat, M. P. M. und Leebeek, F. W. G. (2014). **Von Willebrand factor and ADAMTS13 in arterial thrombosis: a systematic review and meta-analysis.** Blood Reviews 28, 167-178, doi: 10.1016/j.blre.2014.04.003.
- Stier, B., Weissenrieder, N. und Schwab, K. O. (2018). **Jugendmedizin.**
- Sumpio, B. E., Timothy Riley, J. und Dardik, A. (2002). **Cells in focus: endothelial cell.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 34, 1508-1512, doi: 10.1016/S1357-2725(02)00075-4.
- Tezduyar, T., Sathe, S., Cragin, T., Nanna, B., S. Conklin, B., Pausewang, J. und Schwaab, M. (2007). **Modeling of fluid-structure interactions with the space-time finite elements: Arterial fluid mechanics,** Bd. 54.
- Tomer, A., Leopold, G., Hyoungsu, B., R., M. J., V., J. M. und E., K. G. (2010). **Modeling of blood flow in arterial trees.** Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine 2, 612-623, doi: 10.1002/wsbm.90.
- Turgeon, M. L. (2005). **Clinical Hematology: Theory and Procedures,** Bd. Fourth Edition, Lippincott Williams & Wilkins.
- Turlo, K. A., Gallaher, S. D., Vora, R., Laski, F. A. und Iruela-Arispe, M. L. (2010). **When Cre-Mediated Recombination in Mice Does Not Result in Protein Loss.** Genetics 186, 959-967, doi: 10.1534/genetics.110.121608.
- van Breugel, H., de Groot, P., Heethaar, R. und Sixma, J. (1992). **Role of plasma viscosity in platelet adhesion.** Blood 80, 953-959.
- Van Craenenbroeck, K., Vanhoenacker, P. und Haegeman, G. (2000). **Episomal vectors for gene expression in mammalian cells.** European Journal of Biochemistry 267, 5665-5678, doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01645.x.
- Van Lint, P. und Libert, C. (2007). **Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation.** Journal of Leukocyte Biology 82, 1375-1381, doi: 10.1189/jlb.0607338.
- van Royen, N., Piek, J. J., Schaper, W. und Fulton, W. F. (2009). **A Critical Review of Clinical Arteriogenesis Research.** Journal of the American College of Cardiology 55, 17-25, doi: 10.1016/j.jacc.2009.06.058.
- Wagner, A. H., Gülden-zoph, B., Lienenlücke, B. und Hecker, M. (2004). **CD154/CD40-Mediated Expression of CD154 in Endothelial Cells: Consequences for Endothelial Cell-Monocyte Interaction.**

- Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 24, 715–720, doi: 10.1161/01.ATV.0000122853.99978.b1.
- Wagner, A. H., Hildebrandt, A., Baumgarten, S., Jungmann, A., Müller, O. J., Sharov, V. S., Schöneich, C. und Hecker, M. (2011). **Tyrosine nitration limits stretch-induced CD40 expression and disconnects CD40 signaling in human endothelial cells.** Blood 118, 3734-3742, doi: 10.1182/blood-2010-11-320259.
- Wagner, A. H., Schwarz, M., König, G. und Hecker, M. (2014). **Role of platelet CD40 ligand for endothelial cell-monocyte interaction in the presence of flow.** Korea-Australia Rheology Journal 26, 405-408, doi: 10.1007/s13367-014-0046-9.
- Wang, X., Wolf, M., Bänziger Keel, R., Lehner, R. und Hunziker, P. (2012). **Polydimethylsiloxane embedded mouse aorta ex vivo perfusion model: Proof-of-concept study focusing on atherosclerosis**, Bd. 17.
- Warboys, C. M., Amini, N., de Luca, A. und Evans, P. C. (2011). **The role of blood flow in determining the sites of atherosclerotic plaques.** F1000 Medicine Reports 3, 5, doi: 10.3410/M3-5.
- WHO, W. H. O. (2017). **The top 10 causes of death.** URL: <http://new.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> [Stand:30.04.2018].
- Williams, K. J. und Tabas, I. (1995). **The Response-to-Retention Hypothesis of Early Atherogenesis.** Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 15, 551-561.
- Withers, P. C. (1992). **Comparative Animal Physiology**, Saunders College Publishing, Fort Worth Texas USA.
- Woollard, K. J. und Geissmann, F. (2010). **Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions.** Nature reviews. Cardiology 7, 77-86, doi: 10.1038/nrcardio.2009.228.
- Yun, S.-H., Sim, E.-H., Goh, R.-Y., Park, J.-I. und Han, J.-Y. (2016). **Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers.** BioMed Research International 2016, 9060143, doi: 10.1155/2016/9060143.
- Zadelaar, S. M., Boesten, L. S. M., Pires, N. M. M., van Nieuwkoop, A., Biessen, E. A. L., Jukema, W., Havekes, L. M., van Vlijmen, B. J. M. und van Dijk, K. W. (2006). **Local Cre-Mediated Gene Recombination in Vascular Smooth Muscle Cells in Mice.** Transgenic Research 15, 31-36, doi: 10.1007/s11248-005-3226-z.

- Zheng, B., Sage, M., Sheppeard, E. A., Jurecic, V. und Bradley, A. (2000).
**Engineering Mouse Chromosomes with Cre-loxP: Range, Efficiency,
and Somatic Applications.** *Molecular and Cellular Biology* 20, 648-655.
- Zheng, Y., Chen, J. und López, J. A. (2015). **Flow-driven assembly of VWF fibres
and webs in in vitro microvessels.** *Nature Communications* 6, 7858, doi:
10.1038/ncomms8858.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Markus Hecker gilt mein besonderer Dank für das Ermöglichen dieser interessanten und herausfordernden Doktorarbeit.

Meinem Gruppenleiter Herrn PD Dr. Andreas Wagner möchte ich herzlich für seine Betreuung danken. Seine ruhige und verständnisvolle Art, in der er sich auch nicht durch meine schweizerischen Wort-Kreationen beirren ließ, hat mir sehr geholfen.

Von den Labormitarbeitern möchte ich allen voran Franziska Mohr danken. Ihre Unterstützung bei den Perfusionsversuchen, die ohne ein zweites Paar Hände nicht zeitnah zu bewältigen gewesen wären, war sehr wertvoll.

Nadine Heselmaier danke ich dafür, dass sie regelmäßig wortwörtlich ihr Blut für diese Arbeit gegeben hat.

Auch allen weiteren Mitarbeitern im Labor (Azubis, naturwissenschaftlichen und medizinischen Doktoranden, technischen Angestellten und Postdocs), die zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre beitrugen, danke ich an dieser Stelle.

Meinen Eltern und meiner Schwester bin ich für ihre fortwährende Unterstützung dankbar.

Schlussendlich möchte ich auch meiner Freundin Stefanie Schumacher dafür danken, dass sie während meines Auslandsaufenthaltes immer für mich da war und mir stets Rückhalt gab.

In diesem Sinne:

Merci vielmal a alli wo uf ihri eigeni Art zum Glinge vo däre Arbet biitreit hend!